

Document made available under the Patent Cooperation Treaty (PCT)

International application number: PCT/EP05/050728

International filing date: 18 February 2005 (18.02.2005)

Document type: Certified copy of priority document

Document details: Country/Office: IT
Number: RM2004A000091
Filing date: 19 February 2004 (19.02.2004)

Date of receipt at the International Bureau: 31 May 2005 (31.05.2005)

Remark: Priority document submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b)



World Intellectual Property Organization (WIPO) - Geneva, Switzerland
Organisation Mondiale de la Propriété Intellectuelle (OMPI) - Genève, Suisse

PCT/EP2005/050728

09 MAY 2005



Ministero delle Attività Produttive

Direzione Generale per lo Sviluppo Produttivo e la Competitività

Ufficio Italiano Brevetti e Marchi

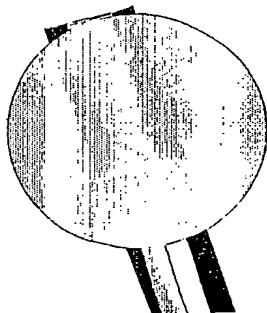
Ufficio G2



Autenticazione di copia di documenti relativi alla domanda di brevetto per:
INVENZIONE INDUSTRIALE N. RM 2004 A 000091

Si dichiara che l'unità copia è conforme ai documenti originali
depositati con la domanda di brevetto sopra specificata, i cui dati
risultano dall'accluso processo verbale di deposito.

Roma, li..... 13 APR. 2005



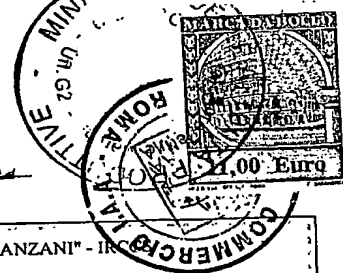
IL FUNZIONARIO

..... *P. L. Pellicani*
Dir. Ufficio G2

MODULO A (1/2)

AL MINISTERO DELLE ATTIVITA' PRODUTTIVE
UFFICIO ITALIANO BREVETTI E MARCHI (U.I.B.M.)
DOMANDA DI BREVETTO PER INVENZIONE INDUSTRIALE

RM 2004 A 000091



A. RICHIEDENTE/I

COGNOME E NOME O DENOMINAZIONE	A1	ISTITUTO NAZIONALE PER LE MALATTIE INFETTIVE "LAZZARO SPALLANZANI" - IRCCS		
NATURA GIURIDICA (PF / PG)	A2	PG	COD. FISCALE PARTITA IV	A3 05080991002
INDIRIZZO COMPLETO	A4	VIA PORTUENSE, 292 - ROMA		
COGNOME E NOME O DENOMINAZIONE	A1			
NATURA GIURIDICA (PF / PG)	A2		COD. FISCALE PARTITA IV	A3
INDIRIZZO COMPLETO	A4			
B. RECAPITO OBBLIGATORIO IN MANCANZA DI MANDATARIO	B0	R	(D = DOMICILIO ELETTIVO, R = RAPPRESENTANTE)	
COGNOME E NOME O DENOMINAZIONE	B1	NOTARBARTOLO & GERVAZI SPA		
INDIRIZZO	B2	VIA SAVOIA, 82		
CAP / LOCALITA' / PROVINCIA	B3	00198 ROMA		
C. TITOLO	C1	TEST IMMUNOLOGICO RAPIDO PER LA DIAGNOSI ED IL MONITORAGGIO DELL'INFEZIONE TUBERCOLARE		

D. INVENTORE/I DESIGNATO/I (DA INDICARE ANCHE SE L'INVENTORE COINCIDE CON IL RICHIEDENTE)

COGNOME E NOME	D1	GOLETTI DELIA
NAZIONALITA'	D2	ITALIANA
COGNOME E NOME	D1	VINCENTI DONATELLA
NAZIONALITA'	D2	ITALIANA
COGNOME E NOME	D1	CARRARA STEFANIA
NAZIONALITA'	D2	ITALIANA
COGNOME E NOME	D1	GIRARDI ENRICO
NAZIONALITA'	D2	ITALIANA

SEZIONE	CLASSE	SOTTOCLASSE	GRUPPO	SOTTOGRUPPO
E1	E2	E3	E4	E5

E. CLASSE PROPOSTA

F. PRIORITA'

DERIVANTE DA PRECEDENTE DEPOSITO ESEGUITO ALL'ESTERO

STATO O ORGANIZZAZIONE	F1	TIPO	F2
NUMERO DOMANDA	F3	DATA DEPOSITO	F4
STATO O ORGANIZZAZIONE	F1	TIPO	F2
NUMERO DOMANDA	F3	DATA DEPOSITO	F4
G. CENTRO ABILITATO DI RACCOLTA COLTURE DI MICROORGANISMI	G1		
FIRMA DEL / DEI RICHIEDENTE / I			

MODULO A (2/2)

I. MANDATARIO DEL RICHIEDENTE PRESSO L'UIBM

LA/E SOTTOINDICATA/E PERSONA/E HA/HANNO ASSUNTO IL MANDATO A RAPPRESENTARE IL TITOLARE DELLA PRESENTE DOMANDA INNANZI ALL'UFFICIO ITALIANO BREVETTI E MARCHI CON L'INCARICO DI EFFETTUARE TUTTI GLI ATTI AD ESSA CONNESSI, CONSAPEVOLE/I DELLE SANZIONI PREVISTE DALL'ART.76 DEL D.P.R. 28/12/2000 N.455.

UMERO ISCRIZIONE ALBO E NOME	11	465 BM - MARIA VITTORIA PRIMICERI
DENOMINAZIONE STUDIO	12	NOTARBARTOLO & GERVAZI SPA
INDIRIZZO	13	VIA SAVOIA, 82
CAP/ LOCALITA'/PROVINCIA	14	00198 ROMA
L. ANNOTAZIONI SPECIALI	L1	NESSUNA

M. DOCUMENTAZIONE ALLEGATA O CON RISERVA DI PRESENTAZIONE

TIPO DOCUMENT	N. ES. ALL.	N. ES. RIS.	N. PAG. PER ESEMPLARE
PROSPETTO A, DESCRIZ., RIVENDICAZ.	01		60
DISEGNI (OBBLIGATORI SE CITATI IN DESCRIZIONE)	01		07
DESIGNAZIONE D'INVENTORE	NO		
DOCUMENTI DI PRIORITA' CON TRADUZION IN ITALIANO	NO		
AUTORIZZAZIONE O ATTO DI CESSIONE	NO		

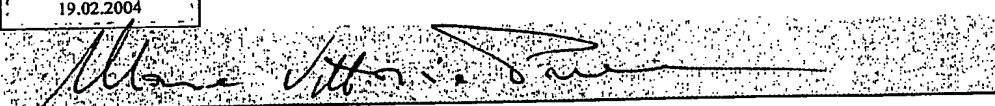
	(SI/NO)
LETTERA D'INCARICO	SI
PROCURA GENERALE	NO
RIFERIMENTO A PROCURA GENERALE	NO

IMPORTO VERSATO ESPRESSO IN LETTERE


ATTESTATI DI VERSAMENTO
FOGLIO AGGIUNTIVO PER I SEGUENTI PARAGRAF (BARRARE I PRESCELTI DEL PRESENTE ATTO SI CHIEDE COPIA AUTENTICA ? (SI/NO)
SI CONCEDE ANTICIPATA ACCESSIBILITA' AL PUBBLICO? (SI/NO)

Euro	QUATTROCENTOSETTANTADUE/56		
A	D	F	
SI			
NO			
DATA DI COMPILAZIONE	19.02.2004		

FIRMA DEL/DEI RICHIEDENTE/I



VERBALE DI DEPOSITO

NUMERO DI DOMANDA	RM 2004 A 000091		
C.C.I.A.A. 1	Roma COD. 58		
IN DATA	19 FEB. 2004	IL/1 RICHIEDENTE/I SOPRAINDICATO/I HA/HANNO PRESENTATO A ME SOTTOSCRITTO	
L. PRESENT DOMANDA CORREDATA DI N.	01	FOGL AGGIUNTIV PE L CONCESSIONE DE BREVETTO SOPRA RIPORTATO.	
N. ANNOTAZIONI VARIE DELL'UFFICIALE ROGANTE			
IL DEPOSITANTE			
	L'UFFICIALE ROGANTE L'Ufficiale Rogante Vanessa Di Bartolomeo		

FOGLIO AGGIUNTIVO MODULO A

DOMANDA DI BREVETTO PER INVENZIONE INDUSTRIALE N° **RM 2004 A 000091**

FOGLIO AGGIUNTIVO N.

01

DI TOTALI:

01

A. RICHIEDENTE/I

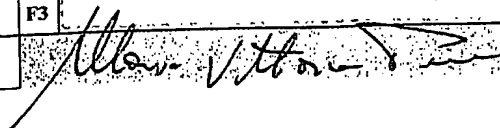
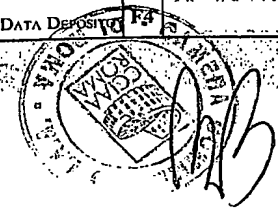
COGNOME E NOME O DENOMINAZIONE	A1			
NATURA GIURIDICA (PF / PG)	A2	COD. FISCALE PARTITA IV	A3	
INDIRIZZO COMPLETO	A4			
COGNOME E NOME O DENOMINAZIONE	A1			
NATURA GIURIDICA (PF / PG)	A2	COD. FISCALE PARTITA IV	A3	
INDIRIZZO COMPLETO	A4			
COGNOME E NOME O DENOMINAZIONE	A1			
NATURA GIURIDICA (PF / PG)	A2	COD. FISCALE PARTITA IV	A3	
INDIRIZZO COMPLETO	A4			
COGNOME E NOME O DENOMINAZIONE	A1			
NATURA GIURIDICA (PF / PG)	A2	COD. FISCALE PARTITA IV	A3	
INDIRIZZO COMPLETO	A4			

D. INVENTORE/I DESIGNATO/I

COGNOME E NOME	D1	POCCIA FABRIZIO
NAZIONALITÀ	D2	ITALIANA
COGNOME E NOME	D1	CASETTI RITA
NAZIONALITÀ	D2	ITALIANA
COGNOME E NOME	D1	AMICOSANTE MASSIMO
NAZIONALITÀ	D2	ITALIANA
COGNOME E NOME	D1	
NAZIONALITÀ	D2	
COGNOME E NOME	D1	
NAZIONALITÀ	D2	
COGNOME E NOME	D1	
NAZIONALITÀ	D2	

F. PRIORITA'

DERIVANTE DA PRECEDENTE DEPOSITO ESEGUITO ALL'ESTERO

STATO O ORGANIZZAZIONE	F1		Tipo	F2	
NUMERO DOMANDA	F3		DATA DEPOSITO	F4	
STATO O ORGANIZZAZIONE	F1		Tipo	F2	
NUMERO DOMANDA	F3		DATA DEPOSITO	F4	
STATO O ORGANIZZAZIONE	F1		Tipo	F2	
NUMERO DOMANDA	F3		DATA DEPOSITO	F4	
FIRMA DEL / DEI RICHIEDENTE / I	 				

PROSPETTO MODULO A
DOMANDA DI BREVETTO PER INVENZIONE INDUSTRIALE

NUMERO DELLA DOMANDA

RM 2004 A 000091

DATA DI DEPOSITO:

19 FEB. 2004

A. RICHIEDENTE/I COGNOME E NOME O DENOMINAZIONE, RESIDENZA O STATO:

ISTITUTO NAZIONALE PER LE MALATTIE INFETTIVE "LAZZARO SPALLANZANI" - IRCCS
VIA PORTUENSE, 292 - ROMA

C. TITOLO

TEST IMMUNOLOGICO RAPIDO PER LA DIAGNOSI ED IL MONITORAGGIO DELL'INFEZIONE TUBERCOLARE

SEZIONE

CLASSE

SOTTOCLASSE

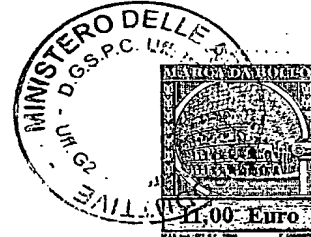
GRUPPO

SOTTOGRUPPO

E. CLASSE PROPOSTA

O. RIASSUNTO

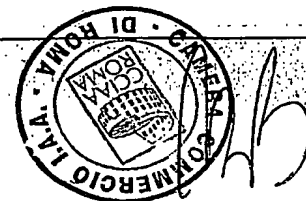
L'invenzione riguarda un test immunologico rapido per la diagnosi ed il monitoraggio dell'infezione tubercolare nelle sue distinte presentazioni di malattia tubercolare attiva, infezione tubercolare latente ed infezione tubercolare recente. Il metodo è basato sulla valutazione della frequenza dei linfociti T antigene-specifici produttori IFN-gamma in risposta ad un pool di peptidi, selezionati mediante analisi computerizzata, di ESAT-6 e CFP-10 che sono proteine specifiche di M. tuberculosis. La risposta a questi peptidi può essere valutata con 3 tecniche, a seconda della disponibilità e delle esigenze del laboratorio: l'enzyme linked immunospot (ELISPOT), l'analisi citofluorimetrica mediante fluorescent activated cell sorter (FACS) e il test immuno-enzimatico mediante l'enzyme linked immuno sorbent assay (ELISA) su sangue intero. In generale ogni test può essere fornito come un insieme di reattivi pronti per l'uso in un kit diagnostico. La lettura dei risultati richiede l'impiego di un lettore ELISPOT o ELISA o di un citofluorimetro.



P. DISEGNO PRINCIPALE

FIRMA DEL / DEI
RICHIEDENTE / I

Marco Vittorio P...



RM 2004 A 000091
Descrizione

della domanda di Brevetto per Invenzione Industriale dal titolo:

"Test immunologico rapido per la diagnosi ed il monitoraggio dell'infezione tubercolare"

a nome Istituto Nazionale per le Malattie Infettive "Lazzaro Spallanzani" - IRCCS di nazionalità italiana

con sede in Via Portuense 292 - 00149 Roma

Inventori designati: GOLETTI Delia, VINCENTI Donatella, CARRARA Stefania, GIRARDI Enrico, POCCIA Fabrizio, CASETTI Rita e AMICOSANTE Massimo

Campo dell'invenzione

La presente invenzione è relativa ad un test immunologico rapido per la diagnosi ed il monitoraggio dell'infezione tubercolare. In particolare il test permette di individuare l'infezione nelle sue distinte presentazioni di malattia tubercolare attiva, infezione tubercolare latente ed infezione tubercolare recente. Il test si basa sull'analisi dei linfociti T antigene-specifici produttori IFN-gamma in risposta a peptidi selezionati di proteine di *Mycobacterium tuberculosis* mediante tecnica ELISPOT, ELISA o FACS, secondo la disponibilità e le esigenze del laboratorio.

Arte nota

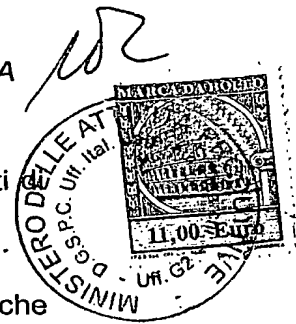
Ogni anno nel mondo ci sono circa 3 milioni di decessi correlati con la tubercolosi (TB) e si stima che un terzo della popolazione mondiale sia infettata con il *M. tuberculosis* (1). La possibilità di rilevare accuratamente e rapidamente l'infezione è cruciale per un controllo globale della malattia.

Attualmente, la diagnosi di TB attiva e, quindi, anche la successiva valutazione dell'efficacia della terapia anti-TB si basano sull'esame colturale per *M. tuberculosis* (sensibilità dell'85%) con tempi di attesa per la risposta tra le 2-6 settimane. I test di biologia molecolare si sono dimostrati utili, ma solo nei campioni batterioscopici positivi (2) e sono accessibili soltanto in laboratori altamente specialistici. Quindi la TB rimane ancora un problema di sanità pubblica, con problemi diagnostici importanti dovuti ai lunghi tempi di attesa necessari per la diagnosi microbiologica e per il monitoraggio dell'efficacia della terapia anti-tubercolare.

Dal punto di vista immunologico è stato evidenziato che *M. tuberculosis in vitro* evoca una forte risposta immunitaria cellulo-mediata con un'alta produzione di interferone-gamma (IFN-gamma). La rilevazione delle cellule T secernenti questa citochina in risposta a questo batterio o a parti di esso è un modo per evidenziare l'avvenuta infezione (3).

Recenti studi sul genoma di *M. tuberculosis* hanno portato all'identificazione di una regione genomica, RD1, che è presente solo nel complesso del *M. tuberculosis* ma assente nel *M. bovis* del BCG (Bacillus Calmette e Guérin), utilizzato per la vaccinazione, e nella maggior parte dei micobatteri ambientali (4). RD1 codifica per Early Secretory Antigenic Target (ESAT)-6 e Culture Filtrate Protein (CFP)-10. Queste proteine, sintetizzate durante la fase attiva di replicazione del batterio, sono un target dominante per l'immunità cellulo-mediata in modelli animali (6, 7), in pazienti con TB (8, 9) ed in contatti (esposizione a *M. tuberculosis*) che svilupperanno la malattia entro 2 anni (10). Per questi motivi, la risposta

delle cellule mononucleate di sangue periferico alle proteine ESAT-6 o CFP-10 (11-14) è stata correlata alla diagnosi di TB utilizzando l'ELISPOT per IFN-gamma. Questa tecnica permette di calcolare la frequenza delle cellule T producenti una determinata citochina (per esempio IFN-gamma) in risposta ad uno specifico stimolo antigenico (per esempio ESAT-6, CFP-10, PPD (Purified Protein Derivative), etc). La risposta all'intera proteina di ESAT-6 o CFP-10 permette di discriminare tra soggetti BCG vaccinati e soggetti con infezione da *M. tuberculosis*. Infatti, solo i soggetti che sono venuti in contatto con *M. tuberculosis*, siano essi BCG vaccinati o non vaccinati, presentano una risposta *in vitro* a queste proteine che sono assenti nel *M. bovis* del BCG. Tale risposta non permette tuttavia di discriminare tra soggetti con tubercolosi attiva rispetto a quelli con infezione latente. A tale scopo, nei nostri laboratori è stato condotto uno studio pilota (15) in cui è stato messo a punto un test immunologico per la diagnosi di TB attiva valutando la produzione di IFN-gamma, mediante ELISPOT. La novità di questo test è nell'utilizzo di 2 peptidi multiepitopici di ESAT-6 da noi selezionati mediante un'analisi computerizzata. La risposta *in vitro* a questi peptidi è risultata essere altamente specifica per la TB attiva. Infatti il 74% dei pazienti con TB attiva ha riconosciuto i peptidi, mentre nessuno dei controlli, compresi coloro con TB latente, lo ha fatto. Tuttavia, sia i soggetti con TB latente, identificati dalla positività al Tuberculin Skin Test (TST), sia coloro con TB attiva riconoscevano la proteina intera di ESAT-6. Il test immunodignostico da noi allestito ha dato buoni risultati anche nei soggetti immunodepressi, come gli HIV⁺. In



generale questi dati suggeriscono che la risposta ai peptidi selezionati ESAT-6 è strettamente associata alla malattia tubercolare in fase attiva. Questi studi hanno apportato utili miglioramenti alle tecniche immunologiche per la diagnosi di TB, evidenziandone tuttavia alcune limitazioni, quali una sensibilità sub-ottimale (74% rispetto all'esame colturale) ed una discreta complessità di esecuzione del test che di fatto lo rende poco proponibile ad una routine laboratoristica. Tali limitazioni e la mancata stima della performance del test nella rilevazione dei contatti di un paziente con TB polmonare bacillifera (infezioni recenti) hanno fatto nascere l'esigenza di un nuovo studio dalla cui elaborazione è scaturita la presente invenzione. In particolare viene qui descritto un test *in vitro* rapido, sensibile, di facile esecuzione per la diagnosi di tubercolosi, utile soprattutto nei casi di diagnosi complessa come ad es. TB attive polmonari con esame batterioscopico negativo o TB attive extra-polmonari che necessitano di esami diagnostici invasivi (interventi chirurgici con conseguenti prelievi bioptici) o contatti recenti di pazienti bacilliferi con TST negativo.

Sommario dell'invenzione

Costituisce pertanto oggetto della presente invenzione un test immunologico rapido per la diagnosi *ex vivo* della tubercolosi nelle sue distinte presentazioni di malattia tubercolare attiva, infezione tubercolare latente ed infezione tubercolare recente. Con questo test si analizzano i linfociti T secernenti IFN-gamma specifici per l'insieme i peptidi selezionati di ESAT-6 e CFP-10 (nel seguito Pep-Sp).

Questo test impiega un metodo rapido per la misurazione della:

- a) frequenza dei linfociti T Pep-Sp produttori IFN-gamma che vengono identificati mediante tecnica ELISPOT su linfo-monociti isolati da sangue periferico
- b) frequenza dei linfociti T Pep-Sp produttori IFN-gamma che vengono identificati mediante tecnica citofluorimetrica su linfo-monociti isolati da sangue periferico
- c) risposta quantitativa in termini di produzione di IFN-gamma dei linfociti T Pep-Sp valutati mediante tecnica ELISA sul plasma derivato dalla stimolazione del sangue intero con gli antigeni (Ag) specifici.

Il test diagnostico oggetto della presente invenzione viene eseguito utilizzando sangue venoso o cellule mononucleate isolate da sangue venoso; è composto da un semplice kit di reattivi e richiede per la lettura dei risultati la disponibilità di un lettore ELISPOT, o di un citofluorimetro, o di un lettore ELISA.

Altri oggetti risulteranno evidenti dalla descrizione dettagliata dell'invenzione.

Breve descrizione delle figure

Figura 1: Risposta ai peptidi selezionati di ESAT-6 e CFP-10 valutata: A) su linfomonociti periferici (PBMC) mediante ELISPOT, B) sul plasma ottenuto da sangue intero mediante ELISA, C) sui PBMC mediante analisi citofluorimetrica

Figura 2, A e B: Risposta dei PBMC ai peptidi selezionati di ESAT-6 e CFP-10 (A) e al PPD (B) valutata mediante analisi ELISPOT in un paziente con TB attiva. T0: momento della diagnosi di TB; T1: dopo 3 mesi di terapia efficace

Figura 3: Schema di procedura della metodica ELISPOT

Figura 4: Schema di procedura della metodica FACS

Figura 5: Schema di procedura della metodica ELISA su sangue intero

Descrizione dettagliata

Come precedentemente descritto, nel nostro laboratorio abbiamo condotto uno studio pilota (15) in cui è stato messo a punto un test immunologico per la diagnosi di tubercolosi capace di discriminare tra TB attiva e latente. La novità del test rispetto a quanto descritto in letteratura, è nell'utilizzo di peptidi di ESAT-6 selezionati mediante un'analisi computerizzata (Tabella 1). La risposta a questi peptidi, valutata come produzione di IFN-gamma mediante ELISPOT, è altamente specifica per la TB attiva.

Tabella 1

Proteina	Posizione	Sequenza nucleotidica e corrispondente sequenza amminoacidica
ESAT-6	6-28	SEQ ID NO: 1 TGGAATTTCGCGGGTATCGAGGCCGCGGCAAGCGCAATCC AGGGAAATGTCACGTCCATTTCCTC
		SEQ ID NO: 2 WNFAGIEAAASAIQGNVTSIHSL
ESAT-6	66-79	SEQ ID NO: 3 AACGCGCTGCAGAACCTGGCGCGGACGATCAGCGAAGCC
		SEQ ID NO: 4 NALQNLARTISEA

Considerate le potenzialità di questo test, abbiamo cercato di apportare alcune modifiche tecniche al fine di aumentarne la sensibilità e di facilitarne l'eseguibilità procedurale. Inoltre abbiamo valutato l'utilità del test nel monitoraggio dell'efficacia della terapia anti-tubercolare.

Sono stati selezionati altri 4 peptidi di CFP-10 che è un'altra proteina specifica di *M. tuberculosis* (Tabella 2). La selezione dei peptidi è stata eseguita mediante tecnica computerizzata ed è basata sull'uso di

particolari software (15, 16-20) al fine di coprire piu' del 90% degli aplotipi dell'HLA di classe II presenti nella popolazione umana.

Tabella 2

Proteina	Posizione	Sequenza nucleotidica e corrispondente sequenza aminoacidica
CFP-10	18-31	SEQ ID NO: 5 TTCGAGCGGATCTCCGGCGACCTGAAAACCCAGATCGACCAG
		SEQ ID NO: 6 FERISGDLKTQIDQ
CFP-10	43-68	SEQ ID NO: 7 GGCCAGTGGCGCGGCGGCGGGGACGGCCGCCAGGCCGCGGTGG TGCGCTTCCAAGAAGCAGCCAATAAGCAGAAGCAGGAA
		SEQ ID NO: 8 GQWRGAAGTAAQAAVVRFQEAANKQKQE
CFP-10	53-68	SEQ ID NO: 9 GCCGCGGTGGTGCCTTCCAAGAAGCAGCCAATAAGCAGAAGCAGG AA
		SEQ ID NO: 10 AAVVRFQEAANKQKQE
CFP-10	74-86	SEQ ID NO: 11 CGAATATTCGTCAAGGCCGCGTCCAATACTCGAGGGCC
		SEQ ID NO: 12 TNIRQAGVQYSRA

Per condurre il test di diagnosi abbiamo utilizzato, oltre alla tecnica ELISPOT già descritta per ESAT-6 (15), altre due nuove metodiche che si sono dimostrate piu' facilmente convertibili ad un uso routinario-commerciale del test rispetto all'ELISPOT, quali la tecnica immuno-enzimatica (eseguita sul plasma di sangue messo in coltura con i peptidi selezionati) e l'analisi citofluorimetrica (di linfomonociti isolati da sangue periferico e messi in coltura con i peptidi selezionati).

Per la valutazione del test abbiamo arruolato nel nostro istituto 22 pazienti con TB attiva (14 maschi e 8 femmine, età media 38 ± 5 , 17 Caucasici, 3 provenienti dall'America Latina e 2 Africani) di cui alcuni provenienti da uno studio precedente recentemente pubblicato (15) e 22 controlli (13 maschi e 9 femmine, età media 35 ± 5 , 18 Caucasici, 2 provenienti



dall'America Latina e 2 Africani) non affetti da malattia tubercolare. Lo studio è stato approvato dal Comitato Etico del nostro Istituto e tutti i pazienti hanno dato il loro consenso scritto.

Tutti i pazienti con malattia tubercolare avevano una TB confermata microbiologicamente: 14 con TB polmonare (espettorato con colturale positivo per *M. tuberculosis*), 4 pleuriti (coltura positiva sul liquido pleurico), 2 con malattia disseminata (coltura positiva su sangue e liquido pleurico) e 2 linfo-adeniti [entrambi con positività alla "polymerase chain reaction" (PCR) per *M. tuberculosis* sulle biopsie]. Quindici pazienti erano HIV⁻ e 7 HIV⁺. Dopo la diagnosi tutti i pazienti sono stati trattati per almeno 2 mesi con 4 farmaci anti-tuberculari: rifampicina, isoniazide, etambutolo e pirazinamide [10]. Cinque pazienti HIV⁺ prendevano terapia antiretrovirale (highly active antiretroviral therapy, HAART) che non includeva inibitori delle proteasi. I dati indicano che 16/22 dei pazienti con TB attiva microbiologicamente dimostrata rispondevano *in vitro* ai pool dei peptidi selezionati di ESAT-6 (sensibilità 73%), 17/22 al pool dei peptidi selezionati di CFP-10 (sensibilità dell'77%), e 18/22 all'insieme dei pool dei peptidi selezionati di ESAT-6 e CFP-10 (sensibilità dell'82%), mentre nessuno dei controlli senza malattia tubercolare attiva rispondeva ai peptidi selezionati. La stimolazione con l'insieme del pool dei peptidi di ESAT-6 e CFP-10 risultava piu' efficiente rispetto alla stimolazione con i singoli peptidi valutati singolarmente in termini di sensibilità, riduzione della complessità sperimentale, minore quantità di sangue richiesta per il prelievo ematico. La figura 1 A mostra i dati ottenuti con l'insieme dei pool selezionati ottenuti con la metodica ELISPOT.

Abbiamo quindi confrontato i risultati ottenuti con la metodica ELISPOT e quelli ottenuti mediante la metodica ELISA su plasma derivato da colture di sangue intero, utilizzando l'insieme dei pool dei peptidi selezionati di ESAT-6 e CFP-10. La sensibilità delle due metodiche risulta abbastanza simile. Nella figura 1B sono riportati i dati relativi ad 11 pazienti con TB attiva microbiologicamente dimostrata. Di questi 8 rispondevano *in vitro* all'insieme dei pool dei peptidi (sensibilità dell'73%).

Inoltre, in un piccolo gruppo di pazienti abbiamo confermato questi risultati mediante metodica citofluorimetrica e ne riportiamo un caso significativo (Figura 1C). Ad esempio, il paziente con TB attiva microbiologicamente accertata, mostrato in figura, ha una frequenza di cellule CD4+ produttori IFN-gamma in risposta al pool dei peptidi selezionati di ESAT-6 e CFP-10 pari allo 0.45 % rispetto al paziente di controllo senza TB attiva che presenta solo lo 0.02%.

Per valutare l'utilizzo del test nel monitoraggio dell'efficacia alla terapia anti-TB, al T1, ossia 3 mesi dopo, il test immunodiagnostico è stato ripetuto sui 18 pazienti con malattia tubercolare attiva che al T0 (momento cioè della diagnosi e quindi dell'inizio della terapia anti-TB) rispondevano *in vitro* mediante test ELISPOT ai pool dei peptidi selezionati di ESAT-6 e CFP-10 (Figura 2A). Contemporaneamente venivano valutati clinicamente e sottoposti ad esami radiologici e di laboratorio. Come mostrato nella Figura 2A, al T1 nei 13 pazienti identificati come "responsivi alla terapia" (7 con TB polmonare bacillifera, il cui espettorato ha successivamente negativizzato e 6 con TB extra-polmonare) la risposta ai pool dei peptidi selezionati di ESAT-6 e CFP-10 era sotto il valore di cut-off. Al contrario,

una risposta positiva a questi peptidi era riscontrata nei 5 pazienti "non responsivi alla terapia" al T1 ($p < 0.0001$ rispetto ai responsivi). Tra questi, 3 avevano la TB polmonare con espettorato ancora coltura positiva per *M. tuberculosis* (2 erano HIV⁺ ed uno di loro era sotto terapia anti-retrovirale) e 2 con TB extra-polmonare con le colture da sangue e da liquido pleurico ancora positive (uno era HIV⁺ non in terapia anti-retrovirale). Tali pazienti erano inoltre caratterizzati al T0 da una malattia clinica severa, sia in termini di estensione della malattia che come condizione di malnutrizione. Al contrario la risposta al PPD era indiscriminatamente presente al T1 in entrambi i gruppi di pazienti (Figura 2B). E' stata valutata anche la risposta alle proteine intere di ESAT-6 e CFP-10; tuttavia, non abbiamo trovato una correlazione con l'andamento clinico (dati non mostrati). Dopo 3 mesi aggiuntivi di terapia, i 5 pazienti che non rispondevano alla terapia al T1 sono stati rivalutati clinicamente ed hanno mostrato una risoluzione della malattia dal punto di vista clinico ed un'assenza di isolamento di *M. tuberculosis* dai rispettivi liquidi biologici. Inoltre, anche la risposta ai peptidi di ESAT-6 e CFP-10 si è negativizzata (dati non mostrati).

Per valutare la performance del test nello studio dei soggetti esposti ad un caso certo di TB polmonare bacillifera, abbiamo arruolato 9 soggetti esposti ad un caso accertato microbiologicamente (espettorato: sonda per RNA e colturale positivi per *M. tuberculosis*). Al momento della diagnosi di TB del paziente bacillifero (T0) e dopo 3 mesi (T1), i 9 soggetti esposti sono stati valutati in base al:

- a) TST , se il test risultava positivo al T0, non veniva ripetuto dopo 3 mesi

- b) test immunodiagnostico di valutazione della risposta alle proteine intere ed ai peptidi selezionati di ESAT-6 e CFP-10
- c) valutazione clinica e valutazione radiologica del torace

Al T0 (tabella 3), il TST risultava positivo in 2 dei 9 soggetti esposti. Al contrario, il test di valutazione della risposta ai peptidi selezionati risultava positivo solamente in 2 soggetti TST negativi, mentre la risposta alle proteine intere risultava positiva in 4/9 soggetti che corrispondevano ai 2 soggetti TST positivi (TB latente) ed ai 2 soggetti con positività *in vitro* ai peptidi selezionati. Nessuno presentava segni clinici o radiologici di TB polmonare.

Al T1, si positivizzava la risposta al TST nei 2 soggetti in cui la risposta ai peptidi selezionati era risultata positiva al T0, e si negativizzava la risposta ai peptidi. La risposta alle proteine intere si manteneva positiva nei 4/9 che erano risultati positivi al T0. Nessuno presentava segni clinici o radiologici di TB polmonare.

Tabella 3. Risposta alla proteina ed ai peptidi di ESAT-6 nei contatti di un paziente con TB polmonare bacillifera.



	T0	T1
TST (positivi/negativi)	2/9	4/9
Risposta ex vivo ai peptidi selezionati di ESAT-6 e CFP-10 (positivi/negativi)	2/9	0/9
Risposta ex vivo alle proteine di ESAT-6 e CFP-10 (positivi/negativi)	4/9	4/9
Valutazione clinica (positivi/negativi)	0/9	0/9
Rx torace (positivi/negativi)	0/9	0/9

Quindi, in conclusione, in questa sezione dello studio abbiamo dimostrato che il test immunodiagnostico basato sulla risposta ai peptidi selezionati di ESAT-6 e CFP-10 può essere utilizzato per la diagnosi di TB attiva, di infezione tubercolare recente (contatto) e per monitorare l'efficacia della terapia anti-tubercolare. Nel caso di TB attiva, la risposta ai peptidi persiste negli individui con TB che non rispondono alla terapia specifica anti-tubercolare, mentre si negativizza dopo 3 mesi di terapia efficace. Una possibile spiegazione è che le proteine secrete da MTB, come ESAT-6 e CFP-10, richiedano bacilli vitali attivamente replicanti al fine di indurre produzione di IFN-gamma da parte di cellule T e questa situazione si verifica sia nei soggetti con malattia attiva, sia in coloro con infezione recente. Al contrario, nel caso di contatti sani dopo 3 mesi dall'esposizione a MTB o, nel caso di TB attiva dopo una terapia efficace,

Il batterio interrompe la sua attività replicativa e la risposta immunitaria contro questi epitopi non è più rilevabile, almeno non con il nostro test. Tuttavia persiste una risposta *in vitro* alle proteine intere ESAT-6 e CFP-10 che probabilmente rimarrà nel corso di tutta la vita, e che sarà indicatrice di un'infezione tubercolare latente.

In sintesi abbiamo messo a punto un test immunodiagnostico semplice e rapido da eseguire per la diagnosi di TB attiva polmonare ed extra-polmonare, per l'infezione tubercolare recente (contatto), e per l'infezione tubercolare latente.

Il test è utile anche per il monitoraggio dell'efficacia della terapia anti-tubercolare avendo evidenziato una correlazione tra la persistenza della risposta positiva ai peptidi selezionati di ESAT-6 e CFP-10 e un fallimento della terapia.

Il test si mostra utile soprattutto nel monitoraggio dell'efficacia della terapia in pazienti con tubercolosi extra-polmonare ed è proprio in questo contesto che il test può essere di elevata utilità. Infatti il test proposto richiede un semplice prelievo di sangue invece di un trattamento chirurgico che, ovviamente, non è sempre fattibile. Inoltre, il nostro test è riproducibile, fornisce una risposta entro 2 giorni e può essere usato in soggetti appartenenti a popolazioni provenienti da diverse aree geografiche (ossia con diverso background immunogenetico) perchè i peptidi selezionati sono largamente riconosciuti.

L'ELISA su sangue intero e l'analisi citofluorimetrica sono metodiche alternative all'ELISPOT che vengono descritte come strumenti altrettanto utili per la diagnosi immunologica di TB attiva e quindi per il monitoraggio

dell'efficacia della terapia anti-TB. Il loro utilizzo è in funzione della disponibilità e delle esigenze del laboratorio. In termini di sensibilità l'ELISPOT e la metodica su sangue intero sono simili, al contrario il FACS risulta essere meno sensibile. In termini di fattibilità, la metodica su sangue intero con metodo di rilevazione immuno-enzimatica su plasma risulta di piu' facile realizzazione per un laboratorio di routine rispetto all'ELISPOT ed alla metodica citofluorimetrica.

Il test immunologico *in vitro* per la diagnosi di TB secondo l'invenzione viene condotto utilizzando un kit diagnostico che comprende almeno un peptide di CFP-10 selezionato nel gruppo consistente di SEQ ID NO 6, SEQ ID NO 8, SEQ ID NO 10, SEQ ID NO 12, e relative miscele. Preferibilmente si utilizza una miscela comprendente almeno un peptide di CFP-10 fra quelli sopra specificati ed almeno un peptide di ESAT-6 scelto nel gruppo consistente di SEQ ID NO 2, SEQ ID NO 4 e relative miscele. Preferibilmente detto kit comprende la seguente serie di reagenti, anche chiamati stimoli nel seguito della descrizione:

- Reagente 1: CTR, terreno di coltura completo
- Reagente 2: CTR, terreno di coltura contenente la concentrazione di dimetil solfossido (DMSO) presente nel reagente 8 e 10
- Reagente 3: CTR, terreno di coltura contenente la concentrazione di dimethyl solfossido (DMSO) presente nel reagente 9
- Reagente 4: PHA, fitoemoagglutinina
- Reagente 5: PPD, Purified Protein Derivative, ad esempio quella fornita dal Statens Serum Institut, Copenhagen, Denmark

- Reagente 6: proteina intatta di ESAT-6, ad esempio quella fornita da (Lionex, Braunschweig, Germany)
- Reagente 7: proteina intatta di CFP-10, ad esempio quella fornita da Lionex, Braunschweig, Germany oppure dallo Statens Serum Institut, Copenhagen, Denmark
- Reagente 8: almeno un peptide di ESAT-6 come sopra detto in DMSO
- Reagente 9: almeno un peptide di CFP-10 come sopra detto in DMSO
- Reagente 10: miscela di peptidi di ESAT-6 e CFP-10, identificati con SEQ ID NO 2, 4, 6, 8, 10, 12 in DMSO
- Istruzioni per la conduzione del test.

Il test secondo l'invenzione può essere condotto anche con i soli reagenti 1, 2, 4, 5, 6, 7, e 10.

Il test secondo l'invenzione, per la sua conduzione, comprende l'esecuzione dei seguenti passaggi fondamentali:

- mettere in contatto un'aliquota di sangue venoso o di cellule mononucleate (PBMC) isolate da sangue venoso con ciascuno dei Reagenti 1-10 e valutare le risposte come appresso indicato;
- incubare a circa 37°C per il tempo necessario ad ottenere la rivelazione attraverso il tipo di saggio prescelto, selezionando fra test ELISPOT, test citofluorimetrico, test ELISA.

La risposta diagnostica si basa sulla valutazione globale dell'analisi ottenuta dalle singole risposte derivate dall'uso dei Reagenti 1-10 usati singolarmente. Tale risposta permette di discriminare fra: paziente con TB attiva; paziente con infezione tubercolare recente (contatto); paziente con TB latente; controllo sano vaccinato con il BCG; controllo sano non

vaccinato e non esposto a MTB; paziente anergico; in caso potendosi monitorare l'efficacia di terapie anti-TB.

Nel caso si utilizzi sangue intero da prelievo venoso questo verrà posto in tubi da saggio contenenti eparina e i risultati verranno rivelati tramite test ELISA; nel caso invece che si utilizzino i PBMC (cellule mononucleate del sangue periferico) i tubi per il prelievo di sangue venoso conterranno EDTA e i risultati verranno rivelati tramite test ELISPOT o citofluorimetria.

Le PBMC possono essere vantaggiosamente isolate tramite centrifugazione su gradiente di densità utilizzando un metodo rapido basato sull'impiego di tubi con filtro per la separazione dei leucociti, l'esperto del ramo è in grado di selezionare la procedura più adeguata ed è anche a conoscenza delle metodiche per condurre i test ELISA, ELISPOT e citofluorimetrico.

Nel caso di rivelazione ELISPOT l'incubazione sarà condotta su PBMC da sangue intero per circa 40 ore (range 38-40 ore); e la determinazione sarà una determinazione quantitativa della produzione di IFN-gamma dei linfociti T Antigene-Specifici come appresso indicato.

Nel caso di rivelazione ELISA l'incubazione sarà condotta con sangue intero per circa 24 ore; e la determinazione sarà una determinazione quantitativa della produzione di IFN-gamma dei linfociti T Antigene-Specifici come appresso indicato.

Nel caso di rivelazione citofluorimetrica l'incubazione sarà condotta con le PBMC per circa 16 ore (range 14-16 ore); e la determinazione sarà una determinazione qualitativa (presenza/assenza di linfociti T Antigene-Specifici) e quantitativa (percentuale e frequenza delle cellule specifiche





per mm³ di sangue) come appresso indicato.

In breve descriviamo la parte sperimentale che riguarda l'esecuzione dell'ELISPOT, dell'ELISA e del FACS. In particolare le cellule mononucleate (PBMC) venivano isolate come descritto in dettaglio nel paragrafo successivo e in letteratura (15). Le cellule venivano quindi trattate in duplicato con i peptidi selezionati aggiunti preferibilmente come pool dei 2 di ESAT-6 a 50 µg/mL, come pool dei 4 di CFP-10 a 8 µg/mL, come pool dell'insieme dei peptidi di ESAT-6 e CFP-10 a 60 µg/mL, con purified protein derivative (PPD) (batch RT47; Statens Serum Institut, Copenhagen, Denmark) a 10 µg/mL, con la fitoemoagglutinina (PHA) (Sigma, St Louis, MO, USA) at 1 µg/mL, con la proteina di ESAT-6 e quella di CFP-10 (Lionex, Braunschweig, Germany) alla concentrazione di 10 µg/mL. I controlli negativi includevano PBMC non stimolati o trattati con DMSO alla stessa concentrazione presente nelle soluzione dei peptidi. La conta delle cellule T specifiche circolanti veniva valutata mediante test ELISPOT come descritto in dettaglio nel paragrafo successivo e in letteratura (15). Gli spot erano contati automaticamente mediante un ELISA-Spot assay video analysis system (AELVIS, Hannover, Germany).

Se l'esperimento veniva condotto su sangue intero, i peptidi selezionati e gli altri reagenti venivano aggiunti direttamente al sangue. Dopo 24 h di incubazione a 37° C, il plasma veniva raccolto e su questo veniva eseguito un test immuno-enzimatico per IFN-gamma. I risultati venivano poi letti tramite lettore ELISA.

Se l'esperimento veniva condotto mediante analisi citofluorimetrica (Figura 2 A), le cellule linfo-mononucleate isolate come sopra descritto, venivano stimulate con i peptidi selezionati e gli altri reagenti. I risultati venivano poi acquisiti ed analizzati tramite citofluorimetro.

Riassumendo, i risultati del test secondo l'invenzione si manifestano attraverso la positività del saggio, in termini di valore assoluto della risposta, che si ottiene sottraendo il valore rilevato mettendo in contatto il campione di sangue intero o PBMC con i singoli Reagenti 1-10 dal valore del controllo (campione in contatto con il Reagente 1 e/o 2 e/o 3). La valutazione della positività del test secondo l'invenzione si effettua verificando la presenza di una risposta significativa come segue:

- (i). paziente con TB attiva o paziente con infezione tubercolare recente (contatto): risposta positiva dovuta al contatto del campione di PBMC o sangue intero con i singoli Reagenti 4-10 (risposta significativa ai Reagenti dal 4 al 10). La risposta positiva viene così evidenziata: per i Reagenti 4-7 la risposta deve essere almeno 3 volte maggiore rispetto al Reagente 1; per il reagente 8 la risposta deve essere almeno 2 volte maggiore rispetto al Reagente 2; per il reagente 9 o 10 la risposta deve essere almeno 4 volte maggiore rispetto al Reagente 3
- (ii). paziente con TB latente: risposta positiva dovuta al contatto del campione di PBMC o sangue intero con i singoli Reagenti 4-7 (assenza di risposta significativa ai peptidi di ESAT-6 e CFP-10).
- (iii). controllo sano vaccinato con il BCG: risposta positiva dovuta al contatto del campione di PBMC o sangue intero con i singoli Reagenti 4-5 (assenza di risposta significativa sia alle proteine che ai peptidi di ESAT-6

e CFP-10).

(iv). controllo sano non vaccinato e non esposto a MTB: risposta positiva dovuta al contatto del campione di PBMC o sangue intero solo per il Reagente 4 (assenza di risposta significativa al PPD, alle proteine ed ai peptidi di ESAT-6 e CFP-10).

(v). paziente anergico: assenza di risposta positiva dopo contatto del campione di PBMC o sangue intero con i singoli Reagenti, compreso il reagente 4 che è un mitogeno al quale rispondono tutte le persone con un sistema immunitario efficiente

(vi). monitoraggio dell'efficacia di terapie anti-TB e della fase di replicazione del micobatterio dopo infezione recente. Al momento della diagnosi di tubercolosi attiva o di infezione recente il campione di PBMC o sangue intero risponde ai Reagenti 4-10 come descritto al punto (i). Al contrario dopo 3 mesi di terapia efficace (scomparsa di un Micobatterio replicante dall'organismo) il campione di PBMC o sangue intero rispondono solo ai reagenti 4-7 (assenza di risposta significativa ai peptidi di ESAT-6 e CFP-10), come descritto al punto (ii)

Il kit può essere impiegato per la diagnosi di TB attiva, per la diagnosi di infezione recente nei contatti sani di un paziente con TB polmonare bacillifera, per eseguire il monitoraggio della risposta alla terapia nella tubercolosi (TB) polmonare ed extra-polmonare, per discriminare tra infezione latente e malattia tubercolare attiva.

Recentemente sono stati sviluppati alcuni test immunologici per la diagnosi della TB; quelli basati sul dosaggio della risposta anticorpale hanno purtroppo una scarsa specificità (22,23) rispetto a quelli basati sulla



misurazione dell'immunità cellulo-mediata, alcuni dei quali sono stati descritti sopra (WO0026248, WO9221697, WO02059605). Tuttavia, nessuno valuta l'utilizzo di questi test come strumenti per il controllo dell'efficacia della terapia anti-tubercolare. Il nostro test è comunque diverso rispetto a quanto descritto in precedenza per:

- 1) l'utilizzo degli antigeni di Mtb (peptidi selezionati vs proteine e/o peptidi sovrapposti)
- 2) il metodo di rilevazione del test: ELISPOT, analisi FACS, ELISA su sangue intero
- 3) l'utilizzo di sangue intero e/o le modalità di separazione dei linfociti
- 4) applicazioni del test (non solo test di diagnosi, ma test per il monitoraggio dell'efficacia della terapia anti-tubercolare)

Descriviamo in dettaglio le varie differenze:

- 1) antigeni di Mtb: peptidi selezionati vs proteine e/o peptidi sovrapposti

L'utilizzo di peptidi come antigeni utilizzati per le stimolazioni *in vitro* è stato già discusso in altri brevetti per la diagnosi immunologica dell'infezione tubercolare (WO02059605; WO0104151; WO0026248; WO9221697 -19 e 38 kda). Tuttavia, la presente invenzione si differenzia perché utilizza un pool di peptidi di proteine secretorie (CFP-10 ed ESAT-6) selezionati mediante tecnica computerizzata diversamente dai precedenti brevetti che utilizzano peptidi sovrapposti di ESAT-6 (WO0026248). Questa nostra peculiarità ci permette di avere un test che discrimina tra TB attiva e latente rispetto a quanto noto in letteratura.

Inoltre per quanto riguarda le proteine di ESAT-6 e CFP-10, noi utilizziamo proteine secretorie ricombinanti differenziandoci dai precedenti brevetti in cui si utilizzano proteine ricombinanti diverse come la 19 e 38 kDa (W09221697) che sono presenti non solo in *M. tuberculosis*, ma anche in altri micobatteri come il *M. bovis*. Questa nostra peculiarità ci permette di avere un test che utilizza proteine di *M. tuberculosis* che non sono solo specifiche per questo micobatterio, ma anche indicative della fase replicativa del micobatterio e quindi della fase attiva di tubercolosi che necessita quindi di trattamento medico

Inoltre questo brevetto si differenzia da quanto noi pubblicato (15) per l'utilizzo sia del pool di peptidi di CFP-10, sia dell'insieme del pool di peptidi di ESAT-6 e CFP-10. Questa modifica potenzia la sensibilità del test.

2) metodo di rilevazione del test: ELISPOT, analisi FACS

Nel caso della metodica ELISPOT usiamo tempi di incubazione diversi (40 h il nostro test rispetto alle 14h di quanto pubblicato in letteratura) [EP1152012; (19)], che nel nostro sistema sperimentale potenziano la sensibilità della risposta. Nessuno inoltre ha utilizzato la metodologia FACS come mezzo diagnostico immunologico per la tubercolosi. Questa metodologia fornisce la possibilità di identificare il tipo di cellule responsabili della risposta al *M. tuberculosis*, consentendo uno studio analitico oltre che quantitativo della risposta.

3) utilizzo di sangue intero e/o le modalità di separazione dei linfomonociti

E' innovativo l'uso di un test immuno-enzimatico (ELISA) per la diagnosi immunologica di TB attiva basandosi sull'utilizzo di sangue intero opportunamente stimolato con peptidi selezionati di proteine secretorie di *M. tuberculosis*. Sul plasma ottenuto si quantifica la produzione di IFN-gamma mediante una metodica ELISA che risulta 30 volte piu' sensibile rispetto a quanto già descritto [WO02059605, WO8705400; (24, 25)]. Questo utilizzo dell'ELISA sul plasma di sangue stimolato con i reagenti è di elevata importanza poiché può portare facilmente ad un uso routinario del test, diversamente dall'ELISPOT in cui l'utilizzo routinario necessita ancora di qualche modifica sperimentale.

Inoltre nella presente invenzione è utilizzato un metodo rapido di separazione per i linfociti circolanti dal campione di sangue (LeucoSep, ARNIKA, Milano) diverso rispetto ad altri brevetti (EP1152012), consentendo di processare piu' campioni allo stesso tempo rispetto ai metodi tradizionali.

4) applicazioni del test. Il test da noi descritto permette il monitoraggio dell'efficacia della terapia anti-tubercolare. Altri studi hanno evidenziato che la risposta a peptidi non selezionati di ESAT-6 e CFP-10 decade dopo terapia efficace (12, 14), ma nessuno ha evidenziato che questo test possa essere uno strumento per valutare l'efficacia della terapia. Questa nostra peculiarità può essere di grande interesse clinico fornendo un modo incruento (un prelievo di sangue) per monitorare l'efficacia della terapia rispetto ad esempio alla necessità talvolta nelle tubercolosi extra-polmonari di eseguire procedure invasive (biopsie o rachicentesi o toracentesi) con notevole riduzione dei relativi costi umani ed economici

Quindi in base a quanto descritto sopra in termini di utilizzo peculiare di antigeni tubercolari e di metodi di rilevazione, questo test si differenzia da quanto precedentemente descritto perché:

- 1) puo' essere utilizzato su campioni ematici umani
- 2) puo' essere utilizzato su campioni ematici di pazienti immuno-compromessi
- 3) utilizza proteine secretorie ricombinanti (CFP-10 ed ESAT-6) ed un pool di peptidi selezionati di proteine secretorie (CFP-10 ed ESAT-6), questi ultimi profondamente diversi per la risposta immunologica evocata dai peptidi sovrapposti di ESAT-6 (WO0026248) o della proteina 19 e 38 kDa (W09221697), come descritto in dettaglio al punto successivo (punto 4). Questi peptidi sono stati selezionati mediante un algoritmo di analisi computerizzata e questa metodologia permette di ottenere peptidi utilizzabili in maniera indipendente dal genotipo dell'ospite e della variabilità del patogeno
- 4) permette la discriminazione tra tubercolosi attiva e latente. Infatti coloro che hanno un'infezione latente rispondono solo alle proteine intere di ESAT-6 e CFP-10, mentre coloro che hanno una malattia attiva rispondono sia al pool di peptidi selezionati mediante tecnica computerizzata che alle proteine intere di ESAT-6 o CFP-10 (vedi esempi)
- 5) permette il monitoraggio dell'efficacia della terapia anti-tubercolare, in quanto la risposta al pool di peptidi selezionati decade nel tempo in caso di terapia anti-tubercolare efficace (responsivi alla terapia); al contrario, in coloro che non rispondono alla terapia e che quindi hanno un



micobatterio attivamente replicante (non responsivi alla terapia), la risposta al pool di peptidi selezionati persiste nel tempo.

6) permette lo studio dei contatti sani esposti ad un caso accertato di TB bacillifera

7) utilizza varie metodiche di rilevazione, non solo l'ELISPOT (WO0026248) ma anche l'ELISA su plasma di sangue intero stimolato con peptidi selezionati per 24 ore e la tecnica del citofluorimetro su cellule mononucleate precedentemente isolate. Le diverse metodiche hanno simili sensibilità e il loro utilizzo è funzione della disponibilità e delle esigenze delle stesse in laboratorio.

Gli esempi seguenti servono ad illustrare la presente invenzione e non sono da considerarsi limitativi dello scopo della medesima.

ESEMPI

Esempio 1: *Procedura di esecuzione del test immunodiagnostico tramite ELISPOT (vedi figura 3)*

L'intera procedura di esecuzione del test richiede un kit contenente: piastra da 96 pozzetti (MAIPS45, Millipore, Sunnyvale, CA, USA); anticorpo primario (IFN-gamma coating monoclonal, M-700A, Pierce-Endogen Inc, Rockford, IL, USA); anticorpo biotinilato (M-701B, Pierce-Endogen Inc); streptavidina-HRP (Pierce-Endogen); substrato (AEC Staining kit, Sigma); 10 tubi contenenti, ognuno, uno stimolo alla concentrazione pronta per l'uso.

La metodica ELISPOT è suddivisa nelle seguenti fasi:

Coating

1. trattare la piastra da 96 pozzetti con l'anticorpo primario diluito in tampone fosfato (PBS) sterile alla concentrazione di 5 μ g/mL, dispensando 100 μ L/pozzetto
2. coprire la piastra e incubare a 4°C per 20 ore
3. lavare la piastra 4 volte con 200 μ L/pozzetto di PBS sterile, all'ultimo lavaggio eliminare l'eccesso di liquido picchiettando la piastra su carta assorbente.

Blocking

1. aggiungere 200 μ L/pozzetto di "blocking solution" [PBS sterile contenente il 10% di siero bovino fetale (FCS)], per prevenire la formazione di legami proteici non specifici
2. incubare la piastra per 2 ore a temperatura ambiente
3. aspirare la "blocking solution"

Preparazione e Incubazione delle cellule

1. isolare le cellule mononucleate (PBMC) da sangue venoso (7 mL con EDTA) tramite centrifugazione su gradiente di densità (Ficoll-Hypaque, Pharmacia; Uppsala; Swedewn), utilizzando un metodo rapido basato sull'impiego di tubi con filtro per la separazione dei leucociti (LeucoSep™, ARNIKA, Milano). Dopo due lavaggi con PBS (phosphate buffered saline) 1x, il pellet viene risospeso in terreno completo (RPMI 1640 con HEPES 25 mM, 10% v/v FCS, 2 mM L-Glutammina, 10 U/mL penicillina/streptomicina) per ottenere una concentrazione cellulare di 3×10^5 cellule in 110 μ L.

2. aggiungere nei pozzetti 110 μ L di sospensione cellulare insieme con 110 μ L dei vari stimoli secondo lo schema della tabella 4 (18 pozzetti: 2 per ogni condizione sperimentale)
3. incubare la piastra per 40 ore a 37°C in incubatore al 5% CO₂
4. rimuovere le cellule
5. lavare la piastra 4 volte con 200 μ L/pozzetto di PBS e 4 volte con 200 μ L/pozzetto di "Wash buffer" [PBS/0,05% Tween 20 (Sigma)]
6. all'ultimo lavaggio eliminare l'eccesso di liquido picchiando la piastra su carta assorbente

Incubazione con l'Anticorpo Biotinilato

1. dispensare 100 μ L/pozzetto di anticorpo biotinilato diluito in PBS/4% albumina serica bovina (fraction V, Sigma) alla concentrazione di 1 μ g/mL
2. incubare per 100 minuti a 37 °C in incubatore al 5% CO₂
3. lavare la piastra 4 volte con "Wash buffer"
4. all'ultimo lavaggio eliminare l'eccesso di liquido picchiando la piastra su carta assorbente

Rivelazione

1. dispensare 100 μ L/pozzetto di "Streptavidina-HRP" diluita 1: 1000 in "Wash buffer"
2. incubare 30 minuti a temperatura ambiente al buio
3. lavare la piastra 4 volte con "Wash buffer"
4. all'ultimo lavaggio eliminare l'eccesso di liquido picchiando la piastra su carta assorbente

5. dispensare 100 μ L/pozzetto di substrato. Controllare che la reazione enzima-substrato funzioni incubando per pochi minuti 100 μ L di substrato appena preparato con 100 μ L di "Streptavidina-HRP" diluita. Se funziona il substrato dal colore marrone chiaro passa al rosa.
6. incubare 10-20 minuti a temperatura ambiente al buio
7. scartare il substrato, sciacquare la piastra con acqua corrente, eliminare l'eccesso di liquido e asciugare all'aria per 20 ore

Tabella 4

	Stimolo e concentrazione d'uso (μ g/mL) (i valori in parentesi sono relativi alle concentrazioni)	Concentrazione soluzione madre (mg/mL)	Quantità da aggiungere (μ L)
1	CTR *	-	-
2	DMSO (8)	0.016	110
3	DMSO (60)	0.12	110
4	PHA (1)	0.02	110
5	PPD (10)	0.02	110
6	ESAT-6 proteina (10)	0.02	110
7	CFP-10 proteina (10)	0.02	110
8	Pool peptidi ESAT-6 (50)	0.1	110
9	Pool peptidi CFP-10 (8)	0.016	110
10	Pool peptidi ESAT-6 e CFP-10 (60)	0.12	110

□ CTR: terreno di coltura completo

Elaborazione dei risultati e formulazione di una risposta diagnostica

Conta degli spot

Gli spot sono contati automaticamente con un analizzatore di immagini (A.EL.VIS, Hannover, Germany).



Le risposte sono considerate positive se la media del numero di spot nei pozzetti delle cellule stimulate con

- a) PHA, PPD, proteine ESAT-6 e CFP-10: è almeno 3 volte maggiore rispetto al numero di spot presenti nei rispettivi pozzetti di controllo contenenti solo cellule
- b) pool peptidi selezionati di CFP-10: è almeno 4 volte maggiore rispetto al numero di spot presenti nei rispettivi pozzetti di controllo contenenti DMSO alla stessa concentrazione di quella utilizzata per diluire i peptidi
- c) pool peptidi selezionati di ESAT-6: è almeno 2 volte maggiore rispetto al numero di spot presenti nei rispettivi pozzetti di controllo contenenti DMSO alla stessa concentrazione di quella utilizzata per diluire i peptidi.
- d) insieme dei pool dei peptidi selezionati di ESAT-6 e CFP-10: è almeno 4 volte maggiore rispetto al numero di spot presenti nei rispettivi pozzetti di controllo contenenti DMSO alla stessa concentrazione di quella utilizzata per diluire i peptidi

Inoltre, se in un pozzetto contenente cellule stimulate il numero di spot è inferiore o uguale a 10, la risposta è considerata negativa.

Per ottenere il valore assoluto, il numero di spot dei pozzetti di controllo è sottratto dal numero di spot delle cellule stimulate. Si è anche costruita una curva Receiver Operator Characteristic (ROC) mediante il software LABROC-1 per ottenere un valore di cut-off specifico per ogni stimolo nella nostra popolazione di studio.

Valutazione dei risultati del test

1a) TB attiva, infezione tubercolare recente (contatto), monitoraggio nel tempo della risposta alla terapia anti-TB

T0: momento della diagnosi di malattia tubercolare in fase attiva o di infezione tubercolare recente. Si esegue il test ELISPOT sui PBMC isolati da sangue periferico. La tabella 5 mostra la media dei valori dei duplicati ottenuti contando gli spot con il lettore automatico:

Tabella 5

	Stimolo e concentrazione d'uso ($\mu\text{g/mL}$) (i valori in parentesi sono relativi alle concentrazioni)	SFCs**/ 3×10^5 cellule
1	CTR*	3
2	DMSO (8)	3
3	DMSO (60)	5
4	PHA (1)	240
5	PPD (10)	180
6	ESAT-6 proteina (10)	195
7	CFP-10 proteina (10)	170
8	Pool peptidi ESAT-6 (50)	101
9	Pool peptidi CFP-10 (8)	125
10	Pool peptidi ESAT-6 e CFP-10 (60)	130

* CTR: terreno di coltura completo

**SFCs: Spot Forming Cells

Il valore assoluto si ottiene sottraendo dal numero di spot delle cellule stimulate il numero di spot dei pozzetti dei rispettivi controlli, come mostrato nella tabella seguente (tabella 6):

Tabella 6

Stimolo e concentrazione d'uso ($\mu\text{g/mL}$) (i valori in	SFCs/ 3×10^5 cellule	Controllo rispettivo	SFCs/ 3×10^5 cellule	Valore assoluto
---	----------------------------------	-------------------------	----------------------------------	--------------------

parentesi sono relativi alle concentrazioni)				
PHA (1)	240	CTR	3	237
PPD (10)	180	CTR	3	177
ESAT-6 proteina (10)	195	CTR	3	192
CFP-10 proteina (10)	170	CTR	3	167
Pool peptidi ESAT-6 (50)	101	DMSO (60)	5	106
Pool peptidi CFP-10 (8)	125	DMSO (8)	6	119
Pool peptidi ESAT-6 e CFP-10 (60)	130	DMSO (60)	5	125

Per il test il campione risulta una TB attiva (o un'infezione recente secondo il contesto clinico, radiologico e microbiologico) perché è positivo, non solo alle proteine, ma anche ai pool di peptidi di ESAT-6 e CFP-10 che sono specifici per la TB attiva. Infatti, la media del numero di spot nei pozzetti delle cellule stimulate con

- a) PHA, PPD, proteine ESAT-6 e CFP-10: è almeno 3 volte maggiore rispetto al numero di spot presenti nei rispettivi pozzetti di controllo contenenti solo cellule
- b) pool peptidi selezionati di CFP-10: è almeno 4 volte maggiore rispetto al numero di spot presenti nei rispettivi pozzetti di controllo contenenti DMSO alla stessa concentrazione di quella utilizzata per diluire i peptidi
- c) pool peptidi selezionati di ESAT-6: è almeno 2 volte maggiore rispetto al numero di spot presenti nei rispettivi pozzetti di controllo contenenti DMSO alla stessa concentrazione di quella utilizzata per diluire i peptidi

d) insieme dei pool dei peptidi selezionati di ESAT-6 e CFP-10: è almeno 4 volte maggiore rispetto al numero di spot presenti nei rispettivi pozzetti di controllo contenenti DMSO alla stessa concentrazione di quella utilizzata per diluire i peptidi
Inoltre i valori ottenuti sono tutti superiori al cut-off calcolato per ogni stimolo.

T1: 3 mesi dopo l'inizio della terapia anti-TB o 3 mesi dopo l'infezione tubercolare recente (contatto).

Nel caso di TB attiva si ripete il test ELISPOT dopo 3 mesi per verificare l'efficacia della terapia anti-tubercolare. Se il paziente ha risposto bene alla terapia farmacologica, il test rimane positivo per le proteine intere di ESAT-6 e CFP-10 (TB latente, vedi esempio successivo 1b), ma negativo per i pool di peptidi selezionati che sono specifici per la TB attiva.

Nel caso di infezione recente il paziente viene richiamato dopo 3 mesi dal contatto con il caso certo di TB bacillifera per eseguire un secondo TST e con l'occasione viene ripetuto il test ELISPOT. Se il paziente non ha sviluppato la malattia, contenendo l'infezione, il test mostrerà, come descritto sopra, positività alle proteine intere di ESAT-6 e CFP-10 (TB latente, vedi esempio successivo 1b), ma negatività ai pool di peptidi selezionati che sono specifici per la TB attiva.

1b) TB latente

La tabella 7 mostra la media dei valori dei duplicati ottenuti contando gli spot con il lettore automatico:

Tabella 7

	Stimolo e concentrazione d'uso (µg/mL) (i valori in parentesi sono relativi alle concentrazioni)	SFCs**/3x10 ⁵ cellule
--	--	----------------------------------

1	CTR*	5
2	DMSO (8)	5
3	DMSO (60)	7
4	PHA (1)	240
5	PPD (10)	180
6	ESAT-6 proteina (10)	195
7	CFP-10 proteina (10)	170
8	Pool peptidi ESAT-6 (50)	6
9	Pool peptidi CFP-10 (8)	7
10	Pool peptidi ESAT-6 e CFP-10 (60)	9



* CTR: terreno di coltura completo

**SFCs: Spot Forming Cells

Il valore assoluto si ottiene sottraendo dal numero di spot delle cellule stimulate il numero di spot dei pozzetti di controllo, come mostrato nella tabella seguente (tabella 8):

Tabella 8

Stimolo e concentrazione d'uso ($\mu\text{g/mL}$) (i valori in parentesi sono relativi alle concentrazioni)	SFCs/ 3×10^5 cellule	Controllo rispettivo	SFCs/ 3×10^5 cellule	Valore assoluto
PHA (5)	240	CTR	5	235
PPD (10)	180	CTR	5	175
ESAT-6 proteina (10)	195	CTR	5	190
CFP-10 proteina (10)	170	CTR	5	165
Pool peptidi ESAT-6 (50)	6	DMSO (60)	5	1
Pool peptidi CFP-10 (8)	7	DMSO (8)	7	0

Pool peptidi ESAT-6 e 9	DMSO (60)	7	2
CFP-10 (60)			

Per il test il campione è risultato TB latente perché è positivo alle proteine, ma negativo ai pool di peptidi di ESAT-6 e CFP-10 che sono specifici per la TB attiva. Infatti, la media del numero di spot nei pozzetti delle cellule stimulate con

- a) PHA, PPD, proteine ESAT-6 e CFP-10: è almeno 3 volte maggiore rispetto al numero di spot presenti nei rispettivi pozzetti di controllo contenenti solo cellule
- b) pool di peptidi selezionati di CFP-10: non è almeno 4 volte maggiore rispetto al numero di spot presenti nei rispettivi pozzetti di controllo contenenti DMSO alla stessa concentrazione di quella utilizzata per diluire i peptidi
- c) pool di peptidi selezionati di ESAT-6: non è almeno 2 volte maggiore rispetto al numero di spot presenti nei rispettivi pozzetti di controllo contenenti DMSO alla stessa concentrazione di quella utilizzata per diluire i peptidi.
- d) insieme dei pool dei peptidi selezionati di ESAT-6 e CFP-10: è almeno 4 volte maggiore rispetto al numero di spot presenti nei rispettivi pozzetti di controllo contenenti DMSO alla stessa concentrazione di quella utilizzata per diluire i peptidi

Inoltre i valori ottenuti sono superiori al cut-off per tutti gli stimoli eccetto che per il pool di peptidi selezionati di ESAT-6 e CFP-10.

Al T0 i pazienti sono arruolati perché sospetti di malattia tubercolare in

fase attiva o perché contatti di pazienti con TB polmonare bacillifera, ma alcuni di essi risultano negativi (TB latente e controlli) o non valutabili (anergici) al test. Di conseguenza, questi pazienti non verranno rivalutati dopo 3 mesi (T1).

1c) controllo sano, vaccinato con il BCG

La tabella 9 mostra la media dei valori dei duplicati ottenuti contando gli spot con il lettore automatico:

Tabella 9

	Stimolo e concentrazione d'uso ($\mu\text{g/mL}$) (i valori in parentesi sono relativi alle concentrazioni)	SFCs**/ 3×10^5 cellule
1	CTR*	3
2	DMSO (8)	5
3	DMSO (60)	5
4	PHA (1)	240
5	PPD (10)	155
6	ESAT-6 proteina (10)	7
7	CFP-10 proteina (10)	6
8	Pool peptidi ESAT-6 (50)	6
9	Pool peptidi CFP-10 (8)	5
10	Pool peptidi ESAT-6 e CFP-10 (60)	5

* CTR: terreno di coltura completo

**SFCs: Spot Forming Cells

Il valore assoluto si ottiene sottraendo dal numero di spot delle cellule stimulate il numero di spot dei pozzetti di controllo, come mostrato nella tabella seguente (tabella 10).

Tabella 10

Stimolo concentrazione ($\mu\text{g/mL}$) (i valori in parentesi sono relativi alle concentrazioni)	e d'uso (i valori in parentesi sono relativi alle concentrazioni)	SFCs/3x10 ⁵ cellule	Controllo rispettivo	SFCs/3x10 ⁵ cellule	Valore assoluto
PHA (1)		240	CTR	3	235
PPD (10)		155	CTR	3	152
ESAT-6 proteina (10)		7	CTR	3	4
CFP-10 proteina (10)		6	CTR	3	3
Pool peptidi ESAT-6 (50)		6	DMSO (60)	5	1
Pool peptidi CFP-10 (8)		5	DMSO (8)	5	0
Pool peptidi ESAT-6 e CFP-10 (60)		5	DMSO (60)	5	0

Per il test il campione è risultato controllo sano, vaccinato con il BCG perché è positivo solo alla PHA e al PPD, ma negativo sia alla proteine che ai pool di peptidi di ESAT-6 e CFP-10. Infatti, la media del numero di spot nei pozzetti delle cellule stimolate con

a) PHA, PPD, proteine ESAT-6 e CFP-10: è almeno 3 volte maggiore rispetto al numero di spot presenti nei rispettivi pozzetti di controllo contenenti solo cellule

b) pool di peptidi selezionati di CFP-10: non è almeno 4 volte maggiore rispetto al numero di spot presenti nei rispettivi pozzetti di controllo contenenti DMSO alla stessa concentrazione di quella utilizzata per diluire i peptidi

c) pool dei peptidi selezionati di ESAT-6: non è almeno 2 volte maggiore rispetto al numero di spot presenti nei rispettivi pozzetti di controllo



contenenti DMSO alla stessa concentrazione di quella utilizzata per diluire i peptidi

d) insieme dei pool dei peptidi selezionati di ESAT-6 e CFP-10: è almeno 4 volte maggiore rispetto al numero di spot presenti nei rispettivi pozzetti di controllo contenenti DMSO alla stessa concentrazione di quella utilizzata per diluire i peptidi.

Inoltre i valori ottenuti sono superiori al cut-off solo per PHA e per PPD.

1d) controllo sano (non BCG vaccinato, mai esposto a *M. tuberculosis*)

La tabella 11 mostra la media dei valori dei duplicati ottenuti contando gli spot con il lettore automatico:

Tabella 11

Stimolo e concentrazione d'uso ($\mu\text{g/mL}$) (i valori in parentesi sono relativi alle concentrazioni)		
1	CTR*	3
2	DMSO (8)	5
3	DMSO (60)	5
4	PHA (1)	240
5	PPD (10)	6
6	ESAT-6 proteina (10)	5
7	CFP-10 proteina (10)	6
8	Pool peptidi ESAT-6 (50)	6
9	Pool peptidi CFP-10 (8)	5
10	Pool peptidi ESAT-6 e CFP-10 (60)	8

* CTR: terreno di coltura completo

****SFCs: Spot Forming Cells**

Il valore assoluto si ottiene sottraendo dal numero di spot delle cellule stimulate il numero di spot dei pozzetti di controllo, come mostrato nella tabella seguente (tabella 12)

Tabella 12

Stimolo e concentrazione d'uso ($\mu\text{g/mL}$) (i valori in parentesi sono relativi alle concentrazioni)	SFCs/ 3×10^5 cellule	Controllo rispettivo	SFCs/ 3×10^5 cellule	Valore assoluto
PHA (5)	240	CTR	3	235
PPD (10)	6	CTR	3	3
ESAT-6 proteina (10)	5	CTR	3	2
CFP-10 proteina (10)	6	CTR	3	3
Pool peptidi ESAT-6 (50)	6	DMSO (60)	5	1
Pool peptidi CFP-10 (8)	5	DMSO (8)	5	0
Pool peptidi ESAT-6 e 8 CFP-10 (60)		DMSO (60)	5	3

Per il test il campione è risultato controllo sano, perché è positivo solo alla PHA, ma negativo al PPD, alla proteine e ai pool di peptidi di ESAT-6 e CFP-10. Infatti, la media del numero di spot nei pozzetti delle cellule stimulate con

a) PHA, PPD e proteine ESAT-6 e CFP-10: è almeno 3 volte maggiore rispetto al numero di spot presenti nei rispettivi pozzetti di controllo contenenti solo cellule

b) pool di peptidi selezionati di CFP-10: non è almeno 4 volte maggiore rispetto al numero di spot presenti nei rispettivi pozzetti di controllo

contenenti DMSO alla stessa concentrazione di quella utilizzata per diluire i peptidi

c) pool di peptidi selezionati di ESAT-6: non è almeno 4 volte maggiore rispetto al numero di spot presenti nei rispettivi pozzetti di controllo contenenti DMSO alla stessa concentrazione di quella utilizzata per diluire i peptidi.

d) insieme dei pool dei peptidi selezionati di ESAT-6 e CFP-10: è almeno 4 volte maggiore rispetto al numero di spot presenti nei rispettivi pozzetti di controllo contenenti DMSO alla stessa concentrazione di quella utilizzata per diluire i peptidi

Inoltre i valori ottenuti sono superiori al cut-off solo per la PHA.

1e) anergico

La tabella 13 mostra la media dei valori dei duplicati ottenuti contando gli spot con il lettore automatico:

Tabella 13

Stimolo e concentrazione d'uso ($\mu\text{g/mL}$) (i valori in parentesi sono relativi alle concentrazioni)			SFCs**/ 3×10^5 cellule
1	CTR*		5
2	DMSO (8)		5
3	DMSO (60)		5
4	PHA (1)		11
5	PPD (10)		6
6	ESAT-6 proteina (10)		5
7	CFP-10 proteina (10)		6
8	Pool peptidi ESAT-6 (50)		6

9	Pool peptidi CFP-10 (8)	5
10	Pool peptidi ESAT-6 e CFP- 3	
	10 (60)	

* CTR: terreno di coltura completo

**SFCs: Spot Forming Cells

Il valore assoluto si ottiene sottraendo dal numero di spot delle cellule stimulate il numero di spot dei pozzetti di controllo, come mostrato nella tabella seguente (tabella 14):

Tabella 14

Stimolo e concentrazione d'uso ($\mu\text{g/mL}$) (i valori in parentesi sono relativi alle concentrazioni)	SFCs/ 3×10^5 cellule	Controllo rispettivo	SFCs/ 3×10^5 cellule	Valore assoluto
PHA (1)	11	CTR	5	6
PPD (10)	6	CTR	5	3
ESAT-6 proteina (10)	5	CTR	5	2
CFP-10 proteina (10)	6	CTR	5	3
Pool peptidi ESAT-6 (50)	6	DMSO (60)	5	1
Pool peptidi CFP-10 (8)	5	DMSO (8)	5	0
Pool peptidi ESAT-6 e 3 CFP-10 (60)		DMSO (60)	5	0

Per il test il campione è risultato anergico, perché è negativo anche alla PHA che è un mitogeno. Infatti, la media del numero di spot nei pozzetti delle cellule stimulate con

a) PHA, PPD e proteine ESAT-6 e CFP-10: non è almeno 3 volte maggiore rispetto al numero di spot presenti nei rispettivi pozzetti di controllo contenenti solo cellule



b) pool di peptidi selezionati di CFP-10: non è almeno 4 volte maggiore rispetto al numero di spot presenti nei rispettivi pozzetti di controllo contenenti DMSO alla stessa concentrazione di quella utilizzata per diluire i peptidi

c) pool di peptidi selezionati di ESAT-6: è minore di 2 volte rispetto al numero di spot presenti nei rispettivi pozzetti di controllo contenenti DMSO alla stessa concentrazione di quella utilizzata per diluire i peptidi

d) insieme dei pool dei peptidi selezionati di ESAT-6 e CFP-10: è almeno 4 volte maggiore rispetto al numero di spot presenti nei rispettivi pozzetti di controllo contenenti DMSO alla stessa concentrazione di quella utilizzata per diluire i peptidi.

Inoltre i valori ottenuti sono tutti inferiori ai rispettivi cut-off.

ESEMPIO 2: Procedura di esecuzione del test immunodiagnostico tramite citofluorimetria (vedi Figura 4)

L'intera procedura di esecuzione del test richiede un kit per citofluorimetria per IFN-gamma composto da: piastra da 24 pozzetti; miscela di anticorpi (Becton-Dickinson, CA); brefeldin-A (Sigma, St.Louis, MO) e 10 tubi contenenti, ognuno, uno stimolo alla concentrazione pronta per l'uso. In particolare la metodica citofluorimetrica è suddivisa nelle seguenti fasi:

- i. isolamento delle cellule mononucleate (PBMC) da sangue venoso
- ii. stimolazione Ag-Sp e incubazione
- iii. colorazione in immunofluorescenza
- iv. acquisizione ed analisi al citofluorimetro
- v. elaborazione della risposta diagnostica.

Per la fase (i), le cellule mononucleate del sangue periferico (PBMC) sono

isolate da un'aliquota di sangue venoso (7ml) tramite centrifugazione su gradiente di densità (Ficoll-Hypaque, Pharmacia; Uppsala; Sweden), utilizzando un metodo rapido basato sull'impiego di tubi con filtro per la separazione dei leucociti (LeucoSep™, ARNIKA, Milano). Dopo due lavaggi con PBS (phosphate buffered saline) 1x, il pellet viene risospeso in terreno completo (RPMI 1640 con HEPES 25 mM, 10% v/v FCS, 2 mM L-Glutamina, 10 U/mL penicillina/streptomicina) per ottenere una concentrazione cellulare di 1×10^6 cellule in 500 μ L.

Nella fase (ii), i PBMC sono aliquotati (500 μ L/pozzetto) in piastra da 24 pozzetti insieme al mitogeno e alle preparazioni antigene-specifiche (Ag-Sp), secondo lo schema della tabella 15. Sono poi incubati a 37 °C per un'ora; successivamente si aggiunge un potente inibitore della secrezione cellulare, come ad esempio Brefeldin-A, e si lascia in incubazione per tutta la notte.

Nella fase (iii), viene eseguita la colorazione in immunofluorescenza delle colture di controllo o stimulate con le preparazioni Ag-Sp secondo tecniche note (26). Per discriminare i linfociti T, le cellule sono colorate con anticorpi monoclonali anti-CD3 specifici per gli antigeni presenti sulla superficie dei linfociti T. Per le nostre esigenze, gli anticorpi preferibilmente utilizzati sono anti-CD3 quale configurazione minima, a cui sostituire o aggiungere anti-CD4 per identificare i linfociti T CD4+ coinvolti nella risposta agli antigeni di MTB utilizzati in questa invenzione. Per determinare la risposta alla stimolazione, vengono impiegati anticorpi specifici per IFN-gamma a livello intracellulare e valutare, così, la produzione di questa citochina in seguito allo stimolo antigenico.

Per l'esecuzione del test vengono utilizzati i seguenti anticorpi monoclonali specifici per antigeni umani: anti-IFN-gamma coniugato con fluoresceina (FITC); anti-CD3 coniugato con ficoeritrina (PE) ed un controllo isotipico (IgG1) coniugato con FITC. Gli anticorpi vengono utilizzati alla concentrazione di 0,25 µg/mL. Ogni nuovo lotto di anticorpi viene testato e gli anticorpi vengono aliquotati in tubi "eppendorf" nelle diverse miscele (mix). In particolare, ciascun anticorpo viene testato e utilizzato in condizioni di saturazione, per escludere differenze tra campioni nella colorazione. I tubi vengono poi posti nel liofilizzatore (Speedvac) fino a completa evaporazione del liquido (20 min). Al momento dell'uso ciascuna mix viene ricostituita mediante l'aggiunta di soluzione salina, e aggiunta al tubo contenente le cellule da analizzare.

Per quanto riguarda la fase (iv), i campioni vengono acquisiti ed analizzati al citofluorimetro con un settaggio strumentale costante, ottenuto mediante un'attenta calibratura quotidiana dello strumento mediante biglie fluorescenti, utilizzando procedure comuni che sono alla portata di un esperto del ramo. L'analisi citofluorimetria della presenza contemporanea dei marcatori di differenziamento dei linfociti T e dell'accumulo di IFN-gamma a livello intracitoplasmatico permette così di ottenere dei risultati sia qualitativi che quantitativi.

Infine, fase (v), la risposta del test è espressa sia a livello qualitativo (presenza/assenza di linfociti T Ag-Sp) che quantitativo (percentuale e frequenza per mmc di sangue). I limiti di sensibilità del citofluorimetro permettono di rilevare differenze percentuali sino allo 0,02%. In ogni caso, è raccomandabile eseguire un'analisi per la definizione dell'intervallo di

4843PTIT

Notarbartolo & Gervasi SpA

NR

normalità in ogni laboratorio.

Tabella 15

	Stimolo e concentrazione d'uso ($\mu\text{g/mL}$) (i valori in parentesi sono relativi alle concentrazioni)	Concentrazione soluzione madre (mg/mL)	Quantità da aggiungere (μL)
1	CTR*	-	-
2	DMSO (8)	0.016	500
3	DMSO (60)	0.12	500
4	PHA (5)	0.02	500
5	PPD (10)	0.02	500
6	ESAT-6 proteina (10)	0.02	500
7	CFP-10 proteina (10)	0.02	500
8	Pool peptidi ESAT-6 (50)	0.1	500
9	Pool peptidi CFP-10 (8)	0.016	500
10	Pool peptidi ESAT-6 e CFP-10 (60)	0.12	500

* CTR: terreno di coltura completo

Elaborazione dei risultati e formulazione di una risposta diagnostica

Questa metodica, come la precedente, permette di identificare le varie tipologie di pazienti: paziente con TB attiva; paziente con infezione tubercolare recente (contatto); paziente con TB latente; controllo sano vaccinato con il BCG; controllo sano non vaccinato e non esposto a MTB; paziente anergico. Anche con questa metodica è possibile monitorare l'efficacia della terapia anti-TB.

Come esempio, in figura 4, sono riportati due pannelli citofluorimetrici relativi ad un paziente con TB attiva ed a un controllo i cui PBMC sono



stimolati con il pool dei peptidi selezionati di ESAT-6 e CFP-10, al T0. I pannelli riportano in ordinata la presenza di IFN-gamma all'interno delle cellule ed in ascissa le cellule T CD4+ che sono coinvolte nella risposta agli antigeni di MTB utilizzati in questa invenzione.

Come si nota nella figura, in caso di TB attiva o di infezione tubercolare recente (contatto) sono presenti cellule CD4+ producenti IFN-gamma (quadrante superiore destro); al contrario, nei pazienti di controllo (senza TB attiva) queste cellule sono assenti.

ESEMPIO 3: Procedura di esecuzione del test immunodiagnostico tramite ELISA su sangue intero (vedi Figura 5)

La metodica ELISA su sangue intero utilizza il QuantiFERON-CMI (QF-CMI, prodotto da Cellestis Limited, Carnegie, Victoria, Australia), opportunamente modificato. In particolare usiamo 0.5 ml di sangue invece che 1 ml e di conseguenza usiamo una piastra da 48 pozzetti invece che da 24. L'intera procedura di esecuzione del test richiede l'utilizzo di un kit contenente: QuantiFERON-CMI per IFN-gamma; piastra da 48 pozzetti e 10 tubi contenenti, ognuno, uno stimolo alla concentrazione pronta per l'uso. In particolare la metodica ELISA su sangue intero è suddivisa nelle seguenti fasi:

Fase 1. Coltura di sangue intero

1. agitare bene le provette contenenti sangue intero eparinato
2. aliquotare il sangue (500 μ l/pozzetto) in piastre sterili da 48 pozzetti
3. aggiungere il mitogeno di controllo e gli antigeni specifici secondo lo schema della Tabella 16
4. agitare bene

5. incubare la piastra a 37°C per 24 ore
6. raccogliere il plasma da ogni pozzetto

Tabella 16

	Stimolo e concentrazione d'uso ($\mu\text{g/mL}$) (i valori in parentesi sono relativi alle concentrazioni)	Concentrazione in soluzione madre per 0.5 ml di sangue (mg/mL)	Quantità da aggiungere (μL)
1	CTR*	-	-
2	DMSO (8)	0.08	50
3	DMSO (60)	0.6	50
4	PHA (1)	0.05	50
5	PPD (10)	0.1	50
6	ESAT-6 proteina (10)	0.1	50
7	CFP-10 proteina (10)	0.1	50
8	Pool peptidi ESAT-6 (50)	0.5	50
9	Pool peptidi CFP-10 (8)	0.08	50
10	Pool peptidi ESAT-6 e CFP-10 (60)	0.6	50

CTR: terreno di coltura completo

Fase 2. ELISA per IFN-gamma

1. preparare il "coniugato" diluendolo nel "green diluent" e dispensarlo nella piastra per l'ELISA, già pronta per l'uso
2. aggiungere il plasma raccolto e lo "standard" nei relativi pozzetti contenenti il "green diluent"
3. miscelare

4. coprire ed incubare la piastra per 2 ore a temperatura ambiente
5. lavare con il "wash buffer"
6. preparare il "cromogeno" 100x diluendolo con "enzyme substrate buffer" e dispensarlo nella piastra
7. coprire ed incubare la piastra per 30 minuti a temperatura ambiente, al buio
8. aggiungere la soluzione di stop per bloccare la reazione e leggere immediatamente la densità ottica di ogni pozzetto a 450/620 nm usando un lettore di micropiastre per ELISA.

Elaborazione dei risultati e formulazione di una risposta diagnostica

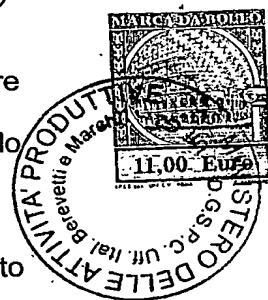
I valori di densità ottica della piastra vengono inseriti in un software fornito dalla ditta produttrice. In questo modo si ottengono la curva standard e i valori di IFN-gamma, espressi in Unità Internazionali (I.U.)/mL, relativi ad ogni pozzetto.

Questa metodica, come le precedenti descritte sopra, permette di identificare le varie tipologie di pazienti: paziente con TB attiva; paziente con infezione tubercolare recente (contatto); paziente con TB latente; controllo sano vaccinato con il BCG; controllo sano non vaccinato e non esposto a MTB; paziente anergico. Anche con questa metodica è possibile monitorare l'efficacia della terapia anti-TB.

Ad esempio, un soggetto con la TB attiva risulta positivo, non solo alle proteine, ma anche ai pool di peptidi di ESAT-6 e CFP-10.

Il valore di IFN-gamma (I.U./mL) nei pozzetti delle cellule stimulate con

- a) PHA, PPD, proteine ESAT-6 e CFP-10: è almeno 3 volte maggiore rispetto al valore di IFN-gamma nei rispettivi pozzetti di controllo contenenti solo cellule
- b) pool peptidi selezionati di CFP-10: è almeno 4 volte maggiore rispetto al valore di IFN-gamma nei rispettivi pozzetti di controllo contenenti DMSO alla stessa concentrazione di quella utilizzata per diluire i peptidi
- c) pool peptidi selezionati di ESAT-6: è almeno 2 volte maggiore rispetto al valore di IFN-gamma nei rispettivi pozzetti di controllo contenenti DMSO alla stessa concentrazione di quella utilizzata per diluire i peptidi.
- d) insieme dei pool dei peptidi selezionati di ESAT-6 e CFP-10: è almeno 4 volte maggiore rispetto al numero di spot presenti nei rispettivi pozzetti di controllo contenenti DMSO alla stessa concentrazione di quella utilizzata per diluire i peptidi.

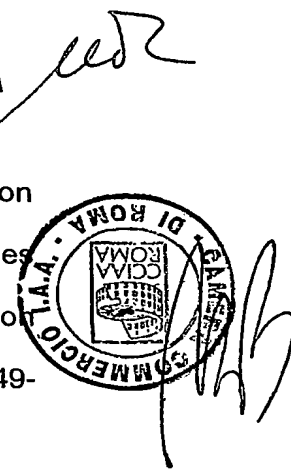


BIBLIOGRAFIA

1. Dye C, Scheele S, Dolin P, Pathania V, Raviglione MC. Consensus statement. Global burden of tuberculosis: estimated incidence, prevalence, and mortality by country. WHO Global surveillance and Monitoring Project. JAMA 1999; 282:677-686.
2. American Thoracic Society. Rapid diagnostic tests for tuberculosis: what is the appropriate use? Am.J.Respir.Crit. Care Med. 1997;155:1804-1811
3. Andersen P, Heron I. Specificity of protective memory immune response against *Mycobacterium tuberculosis*. Infect Immun 1993; 61:844-851.
4. Mahairas GG, Sabo PJ, Hickey MJ, Singh DC, Stover CK. Molecular analysis of genetic differences between *Mycobacterium bovis* BCG and virulent *M. bovis*. J Bacteriol 1996; 178:1274-1282.
5. Harboe M, Oettinger T, Wiker HG, Rosenkrands I, Andersen P. Evidence for occurrence of the ESAT-6 protein in *Mycobacterium tuberculosis* and virulent *Mycobacterium bovis* and for its absence in *Mycobacterium bovis* BCG. Infect Immun 1996; 64:16-22.
6. Andersen P, Andersen AB, Sorensen AL, Nagai S. Recall of long-lived immunity to *Mycobacterium tuberculosis* infection in mice. J Immunol 1995; 154:3359-3372.
7. Pollock JM, Andersen P. Predominant recognition of the ESAT-6 protein in the first phase of interferon with *Mycobacterium bovis* in cattle. Infect Immun 1997; 65:2587-2592.

8. Ulrichs T, Munk ME, Mollenkopf H, Behr-Perst S, Colangeli R, Gennaro ML, Kaufmann SH. Differential T cell responses to *Mycobacterium tuberculosis* ESAT6 in tuberculosis patients and healthy donors. Eur J Immunol 1998; 28:3949-3958.
9. Ravn P, Demissie A, Egualé T, Wondwosson H, Lein D, Amoudy HA, Mustafa AS, Jensen AK, Holm A, Rosenkrands I, Oftung F, Olobo J, von Reyn F, Andersen P. Human T cell responses to the ESAT-6 antigen from *Mycobacterium tuberculosis*. J Infect Dis 1999; 179:637-645.
10. Doherty TM, Demissie A, Olobo J, Wolday D, Britton S, Egualé T, Ravn P, Andersen P. Immune responses to the *Mycobacterium tuberculosis*-specific antigen ESAT-6 signal subclinical infection among contacts of tuberculosis patients. J Clin Microbiol 2002; 40:704-706.
11. Lalvani A, Pathan AA, Durkan H, Wilkinson KA, Whelan A, Deeks JJ, Reece WH, Latif M, Pasvol G, Hill AV. Enhanced contact tracing and spatial tracking of *Mycobacterium tuberculosis* infection by enumeration of antigen-specific T cells, Lancet 2001; 357:2017-2021.
12. Lalvani A, Nagvenkar P, Udawadia Z, Pathan AA, Wilkinson KA, Shastri JS, Ewer K, Hill AV, Mehta A, Rodrigues C. Enumeration of T cells specific for RD1-encoded antigens suggests a high prevalence of latent *Mycobacterium tuberculosis* infection in healthy urban Indians. J Infect Dis 2001; 183:469-477.
13. Lalvani A, Pathan AA, McShane H, Durkan H., Wilkinson K.A., Whelan A., Deeks J.J., Reece W.H.H., Latif M., Pasvol G., Hill A.V.S. Rapid detection of *Mycobacterium tuberculosis* infection by enumeration of antigen-specific T cells. Am J Respir Crit Care Med 2001; 163:824-828.

14. Pathan AA, Wilkinson KA, Klenerman P, McShane H., Davidson R.N., Pasvol G., Hill A.V.S. Lalvani A. Direct ex vivo analysis of antigen-specific IFN-gamma-secreting CD4 T cells in *Mycobacterium tuberculosis*-infected individuals: association with clinical disease state and effect of treatment. J Immunol 2001; 167:5217-5225.
15. Vincenti D, Carrara S, De Mori P, Pucillo LP, Petrosillo N, Palmieri F, Armignacco O, Ippolito G, Girardi E, Amicosante M, Goletti D. Identification of ESAT-6 Epitopes for the Immunodiagnosis of Active Tuberculosis. Mol Med 2003; 9: 105-111.
16. Rammensee H, Bachmann J, Emmerich NP, Bachor OA, Stevanovic S. SYFPEITHI: database for MHC ligands and peptide motifs. Immunogenetics 1999; 50:213-219.
17. Fleckenstein B, Jung G, Wiesmüller KH. Quantitative analysis of peptide-MHC class II interaction. Semin Immunol 1999; 11:405-416.
18. Sturniolo T, Bono E, Ding J, Raddrizzani L, Tuereci O, Sahin U, Braxenthaler M, Gallazzi F, Protti MP, Sinigaglia F, Hammer J. Generation of tissue-specific and promiscuous HLA ligand database using DNA microarrays and virtual HLA class II matrices. Nat Biotechnol 1999; 17:555-561.
19. Singh H, Raghava GP. ProPred: prediction of HLA-DR binding sites. Bioinformatics 2001; 17:1236-1237.
20. Proceedings of the 12th IHWC. HLA Genetic diversity of HLA Functional and Medical Implication. Edited by Charron D. EDK, Medical and Scientific International Publisher, Paris 1997.

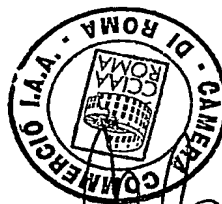


21. Al-Attiah R, Mustafa AS, Abal AT, Madi NM, Andersen P. Restoration of mycobacterial antigen-induced proliferation and interferon-g responses in peripheral blood mononuclear cells of tuberculosis patients upon effective chemotherapy. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 2003; 38:249-256.
22. Gennaro ML. Immunologic diagnosis of tuberculosis. *Clin. Infect. Dis.* 2000; 30:243-246.
23. Silva VM, Kanaujia G, Gennaro ML, Menzies D. Factors associated with humoral response to ESAT-6, 38 kDa and 14 kDa in patients with a spectrum of tuberculosis. *Int J Tuberc Lung Dis.* 2003; 7:478-484.
24. Mazurek GH, LoBue PA, Daley CL, Bernardo J, Lardizabal AA, Bishai WR, Iademarco MF, Rothel JS. Comparison of a whole-blood interferon-gamma assay with tuberculin skin testing for detecting latent *Mycobacterium tuberculosis* infection. *JAMA* 2001; 286:1740-1747.
25. Mazurek GH, Villarino ME. Guidelines for using the QuantiFERON-TB test for diagnosing latent *Mycobacterium tuberculosis* infection. *MMWR* 2002, 51:1-5.
26. Amicosante M, Gioia C, Montesano C, Casetti R, Topino S, D'Offizi G, Cappelli G, Ippolito G, Colizzi V, Poccia F, Pucillo LP. Computer-based design of an HLA-haplotype and HIV-clade independent cytotoxic T-lymphocyte assay for monitoring HIV-specific immunity. *Mol Med* 2002, 8:798-807.

RM 2004 A 000091

Rivendicazioni

1. Test immunologico *in vitro* per la diagnosi ed il monitoraggio dell'infezione tubercolare caratterizzato dal fatto che un'aliquota di sangue venoso intero o di PBMC viene posta in contatto con un'aliquota efficace di reagente contenente almeno un peptide CFP-10 scelto nel gruppo di peptidi seguenti: SEQ ID NO 6, 8, 10, 12 e relative miscele.
2. Test secondo la riv. 1 in cui il reagente contiene in aggiunta almeno un peptide ESAT-6 scelto nel gruppo di peptidi seguenti: SEQ ID NO 2, 4 e relative miscele.
3. Test immunologico *in vitro* per la diagnosi ed il monitoraggio dell'infezione tubercolare comprendente gli stadi di: mettere in contatto un'aliquota di sangue venoso o di cellule mononucleate (PBMC) isolate da sangue venoso con ciascuno dei Reagenti seguenti:
 - Reagente 1: CTR, terreno di coltura completo
 - Reagente 2: CTR, terreno di coltura contenente la concentrazione di dimetil solfossido (DMSO) presente nel reagente 8 e 10
 - Reagente 3: CTR, terreno di coltura contenente la concentrazione di dimethyl solfossido (DMSO) presente nel reagente 9
 - Reagente 4: PHA, fitoemoagglutinina
 - Reagente 5: PPD, Purified Protein Derivative
 - Reagente 6: proteina intatta di ESAT-6
 - Reagente 7: proteina intatta di CFP-10
 - Reagente 8: almeno un peptide di ESAT-6 scelto nel gruppo di peptidi seguenti: SEQ ID NO 2, 4 e relative miscele, in DMSO



- Reagente 9: almeno un peptide di CFP-10 scelto nel gruppo di peptidi seguenti: SEQ ID NO 6, 8, 10, 12 e relative miscele, in DMSO
- Reagente 10: miscela di peptidi di ESAT-6 e CFP-10, identificati con SEQ ID NO 2, 4, 6, 8, 10, 12 in DMSO;

incubare a circa 37°C per il tempo necessario ad ottenere un segnale rivelabile.

4. Test secondo la riv. 3 in cui il segnale è ottenuto attraverso uno fra i saggi seguenti: ELISPOT, citofluorimetria, ELISA.
5. Test secondo le riv. 3 e 4 in cui, nel caso si utilizzi sangue intero da prelievo venoso, questo viene posto in tubi da saggio contenenti eparina e i risultati vengono rivelati tramite ELISA.
6. Test secondo le riv. 3 e 4 in cui, nel caso si utilizzino PBMC (cellule mononucleate del sangue periferico) queste vengono poste in tubi da saggio contenenti EDTA e i risultati vengono rivelati tramite ELISPOT o citofluorimetria.
7. Test secondo la riv. 6 in cui le PBMC vengono ottenute per isolamento da sangue venoso tramite centrifugazione su gradiente di densità utilizzando un metodo basato sull'impiego di tubi con filtro per la separazione di leucociti.
8. Test secondo le riv. 6 e 7 in cui l'incubazione è condotta su PBMC da sangue intero per circa 38-40 ore con successiva determinazione quantitativa ELISPOT della produzione di IFN-gamma di linfociti T Antigene-Specifici.
9. Test secondo le riv. 6 e 7 in cui l'incubazione è condotta su PBMC da sangue intero per circa 14-16 ore con successiva determinazione

citofluorimetrica qualitativa (presenza/assenza di linfociti T Antigene-Secifici) e quantitativa (percentuale e frequenza delle cellule specifiche per mm^3 di sangue) della produzione di IFN-gamma di linfociti T Antigene-Secifici.

10. Test secondo la riv. 5 in cui l'incubazione è condotta con sangue intero per circa 24 ore con successiva determinazione quantitativa ELISA della produzione di IFN-gamma di linfociti T Antigene-Secifici.

11. Test secondo le riv. 3-10 in cui i risultati di detto test vengono valutati in termini di valore assoluto di una risposta significativa rilevabile, che si ottiene sottraendo il valore rilevato mettendo in contatto il campione di sangue intero o PBMC con i singoli Reagenti 1-10 dal valore del controllo (campione in contatto con il Reagente 1 e/o 2 e/o 3), la valutazione della positività del test essendo effettuata verificando la presenza di una risposta significativa come segue:

- i. paziente con TB attiva o paziente con infezione tubercolare recente (contatto): risposta positiva dovuta al contatto del campione di PBMC o sangue intero con i singoli Reagenti 4-10 (risposta significativa ai Reagenti dal 4 al 10), considerandosi come risposta positiva la seguente: per i Reagenti 4-7 risposta di almeno 3 volte maggiore rispetto a quella per il Reagente 1; per il reagente 8 la risposta dovendo essere almeno 2 volte maggiore rispetto al Reagente 2; per il reagente 9 o 10 la risposta dovendo essere almeno 4 volte maggiore rispetto al Reagente 3;
- ii. paziente con TB latente: risposta positiva dovuta al contatto del campione di PBMC o sangue intero con i singoli Reagenti 4-7

(assenza di risposta significativa ai peptidi di ESAT-6 e CFP-10);

iii. controllo sano vaccinato con il BCG: risposta positiva dovuta al contatto del campione di PBMC o sangue intero con i singoli Reagenti 4-5 (assenza di risposta significativa sia alle proteine che ai peptidi di ESAT-6 e CFP-10);

iv. controllo sano non vaccinato e non esposto a MTB: risposta positiva dovuta al contatto del campione di PBMC o sangue intero solo per il Reagente 4 (assenza di risposta significativa al PPD, alle proteine ed ai peptidi di ESAT-6 e CFP-10);

v. paziente anergico: assenza di risposta positiva dopo contatto del campione di PBMC o sangue intero con i singoli Reagenti, compreso il reagente 4.

12. Test secondo la riv. 11 in cui si effettua un monitoraggio dell'efficacia di terapie anti-TB e della fase di replicazione del micobatterio dopo infezione recente come segue: al momento della diagnosi di tubercolosi attiva o di infezione recente il campione di PBMC o sangue intero risponde ai Reagenti 4-10 come descritto al punto (i), dopo 3 mesi di terapia efficace (scomparsa di un Micobatterio replicante dall'organismo) i campioni di PBMC o sangue intero, rispondono solo ai reagenti 4-7 (assenza di risposta significativa ai peptidi di ESAT-6 e CFP-10), come descritto al punto (ii).

13. Kit diagnostico per la diagnosi ed il monitoraggio dell'infezione tubercolare basato sulla presenza di un reagente comprendente almeno un peptide CFP-10 scelto nel gruppo di peptidi seguenti: SEQ ID NO 6, 8, 10, 12 e relative miscele.



14. Kit diagnostico per la diagnosi ed il monitoraggio dell'infezione tubercolare comprendente i Reagenti seguenti:

- Reagente 1: CTR, terreno di coltura completo
- Reagente 2: CTR, terreno di coltura contenente la concentrazione di dimetil sulfossido (DMSO) presente nel reagente 8 e 10
- Reagente 3: CTR, terreno di coltura contenente la concentrazione di dimethyl sulfossido (DMSO) presente nel reagente 9
- Reagente 4: PHA, fitoemoagglutinina
- Reagente 5: PPD, Purified Protein Derivative
- Reagente 6: proteina intatta di ESAT-6
- Reagente 7: proteina intatta di CFP-10
- Reagente 8: almeno un peptide di ESAT-6 scelto nel gruppo di peptidi seguenti: SEQ ID NO 2, 4 e relative miscele, in DMSO
- Reagente 9: almeno un peptide di CFP-10 scelto nel gruppo di peptidi seguenti: SEQ ID NO 6, 8, 10, 12 e relative miscele, in DMSO
- Reagente 10: miscela di peptidi di ESAT-6 e CFP-10, identificati con SEQ ID NO 2, 4, 6, 8, 10, 12 in DMSO;
- Istruzioni per la conduzione del test.

15. Kit diagnostico secondo la riv. 14 che permette di discriminare fra: paziente con TB attiva; paziente con infezione tubercolare recente (contatto); paziente con TB latente; controllo sano vaccinato con il BCG; controllo sano non vaccinato e non esposto a MTB; paziente anergico.

16. Kit secondo la riv. 14 impiegabile per la diagnosi di TB attiva, per la diagnosi di infezione recente nei contatti sani di un paziente con TB

polmonare bacillifera, per eseguire il monitoraggio della risposta alla terapia nella tubercolosi (TB) polmonare ed extra-polmonare, per discriminare tra infezione latente e malattia tubercolare attiva; per la diagnosi di TB attiva polmonare ed extra-polmonare, per l'infezione tubercolare recente (contatto), e per l'infezione tubercolare latente; per monitorare l'efficacia o meno di terapia anti-tubercolare.

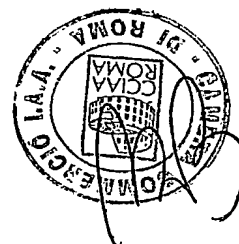
17. Sequenza peptidica SEQ ID NO 6
18. Sequenza peptidica SEQ ID NO 8
19. Sequenza peptidica SEQ ID NO 10
20. Sequenza peptidica SEQ ID NO 12
21. Sequenza nucleotidica SEQ ID NO 5
22. Sequenza nucleotidica SEQ ID NO 7
23. Sequenza nucleotidica SEQ ID NO 9
24. Sequenza nucleotidica SEQ ID NO 11
25. Sequenza nucleotidica che codifica per uno dei peptidi scelto fra SEQ ID NO 6, 8, 10, 12,
26. Impiego di un peptide scelto fra SEQ ID NO 6, 8, 10, 12 per la realizzazione di un test immunologico *in vitro* per la diagnosi ed il monitoraggio dell'infezione tubercolare.

Per Istituto Nazionale per le Malattie Infettive

"Lazzaro Spallanzani" - IRCCS

Il Mandatario

Dr. ssa Maria Vittoria Primiceri



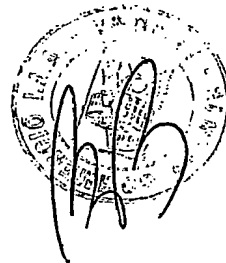
4843PTIT

RM 2004

Notarbartolo & Gervasi SpA

ELENCO SEQUENZE

A 000091



SEQ ID NO 1 corrispondente al peptide 6-28 di ESAT-6

TGGAATTCGCGGGTATCGAGGCCGCGGCAAGCGCAATCCAGGGAA

ATGTCACGTCCATTCAATCCCTC

SEQ ID NO: 2 WNFAGIEAAASAIQGNVTSIHSL

SEQ ID NO 3 corrispondente al peptide 66-79 di ESAT-6

AACGCGCTGCAGAACCTGGCGCGGACGATCAGCGAAGCC

SEQ ID NO: 4 NALQNLARTISEA

SEQ ID NO 5 corrispondente al peptide 18-31 di CFP-10

TTCGAGCGGATCTCCGGCGACCTGAAAACCCAGATCGACCAG

SEQ ID NO: 6 FERISGDLKTQIDQ

SEQ ID NO 7 corrispondente al peptide 43-68 di CFP-10

GGCCAGTGGCGCGGCGCGGCGGGGACGGCCGCCAGGCCGCGGT

GGTGCGCTTCCAAGAAGCAGCCAATAAGCAGAAGCAGGAA

SEQ ID NO:8 GQWRGAAGTAAQAAVVRFQEAANKQKQE

SEQ ID NO 9 corrispondente al peptide 53-68 di CFP-10

GCCGCGGTGGTGCGCTTCCAAGAAGCAGCCAATAAGCAGAAGCAGG

AA

SEQ ID NO: 10 AAVVRFQEAANKQKQE

SEQ ID NO 11 corrispondente al peptide 74-86 di CFP-10

CGAATATTCGTCAGGCCGGCGTCCAATACTCGAGGGCC

SEQ ID NO: 12 TNIRQAGVQYSRA

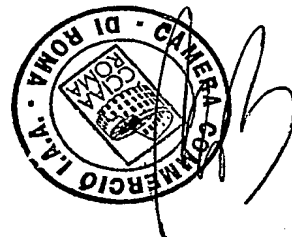
RM 2004 A 000091

4843PTIT

Tavola 1 di 7

Man. Vittor. F.

NOTAR BARTOLO & GERVASI S.p.A.



ELISPOT

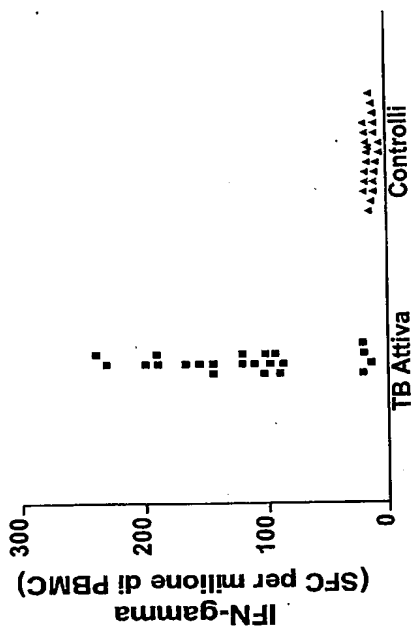


Figura 1A

RM 2004 A 000091

4843PTIT

Tavola 2 di 7

Uberti, Vitoria
NOTAR BARTOLO & GERVASI S.p.A.

ELISA

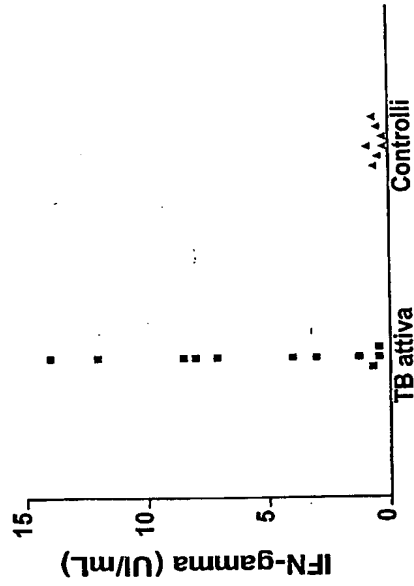
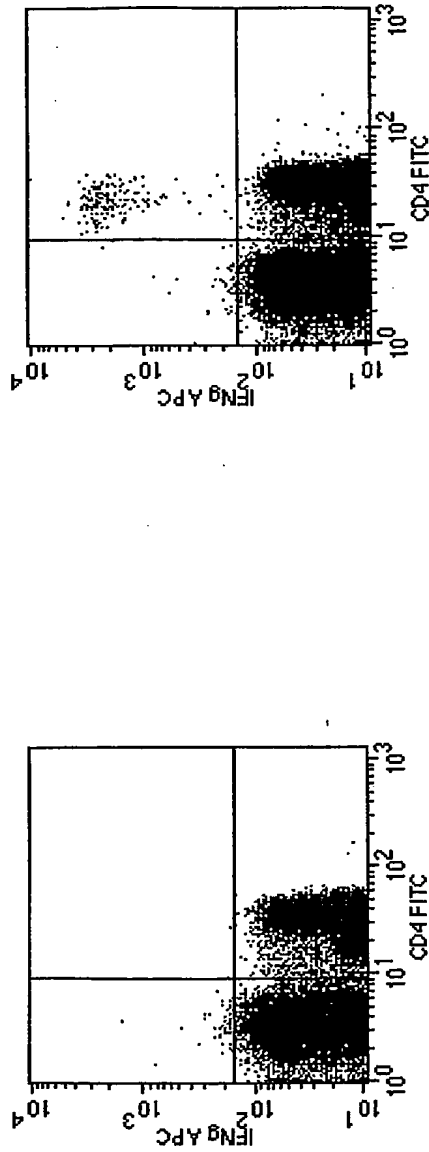


Figura 1B





Figura 1C
Risposta al pool di peptidi
selezionati



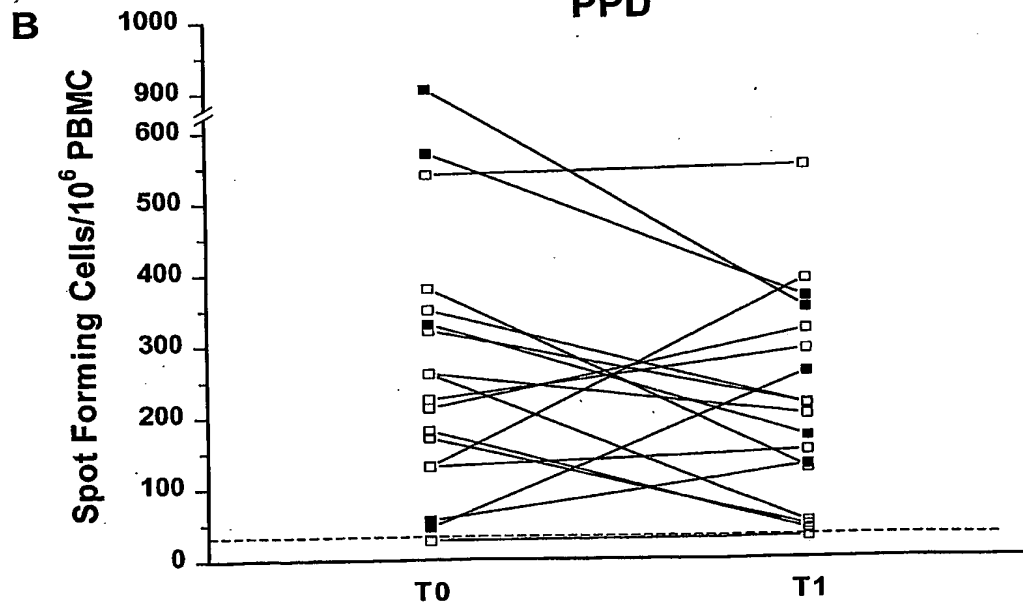
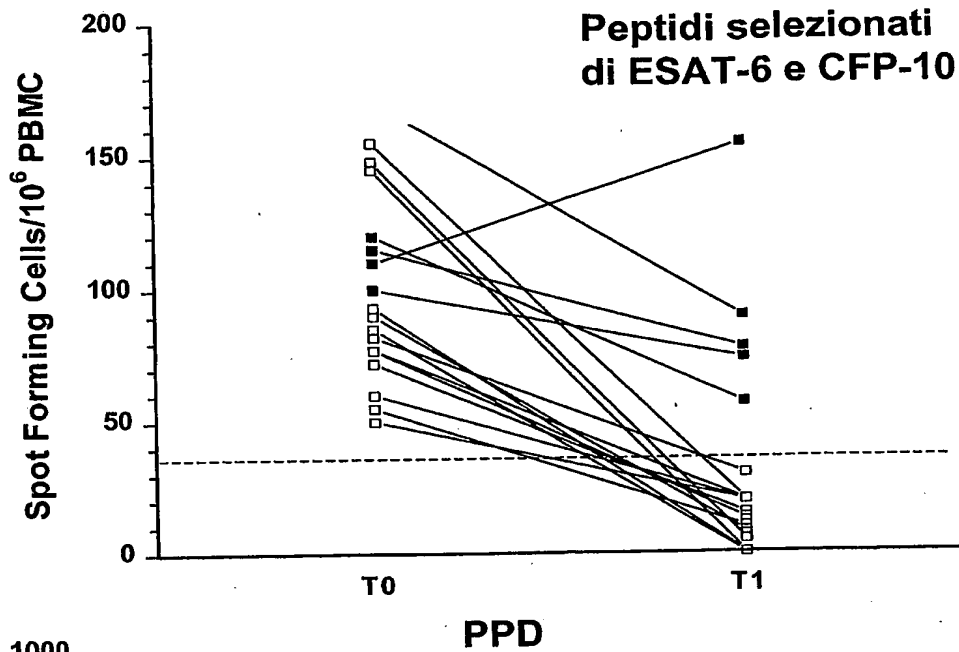
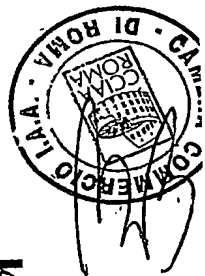
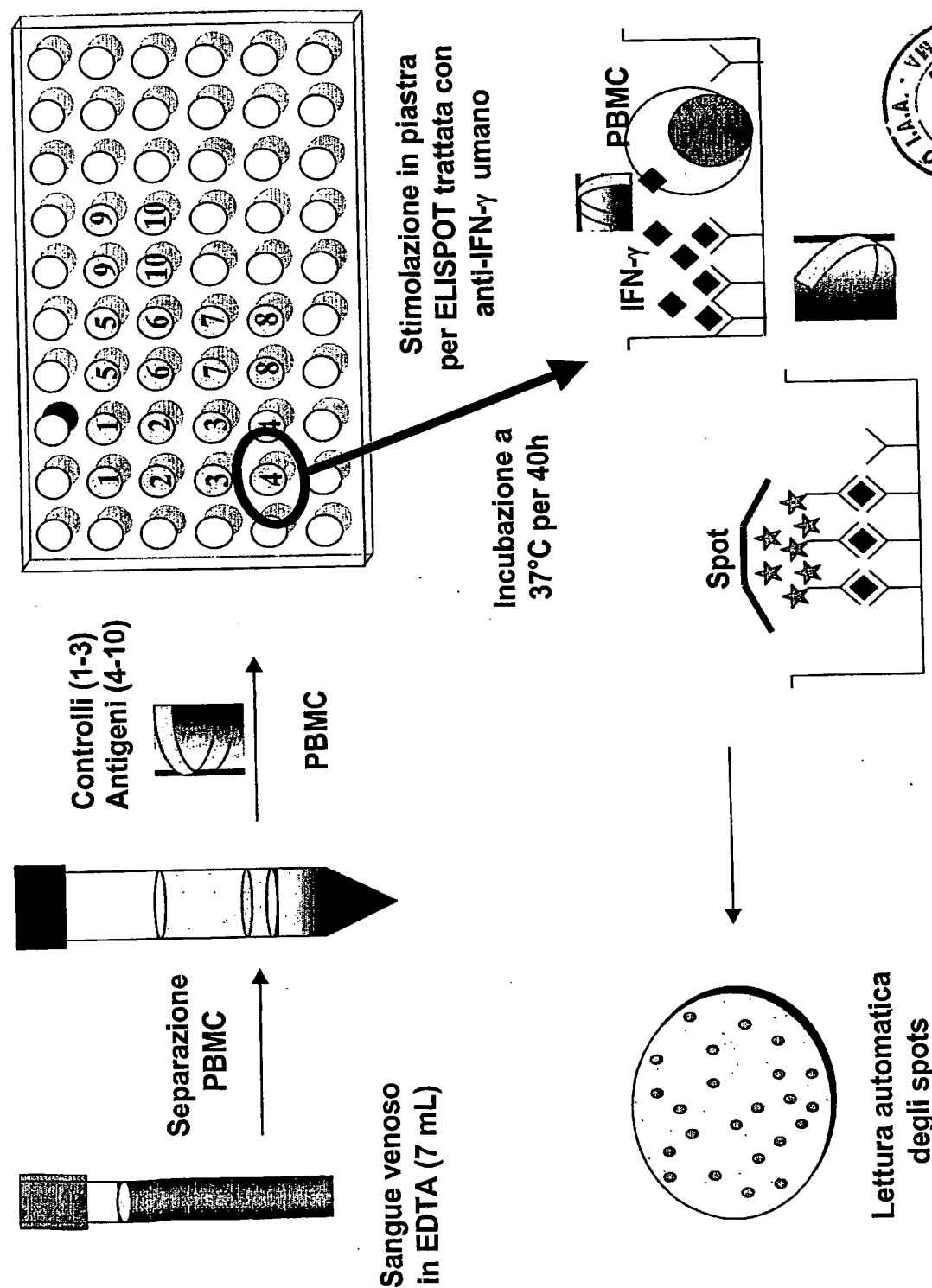


Figura 2

Figura 3

Metodica ELISPOT

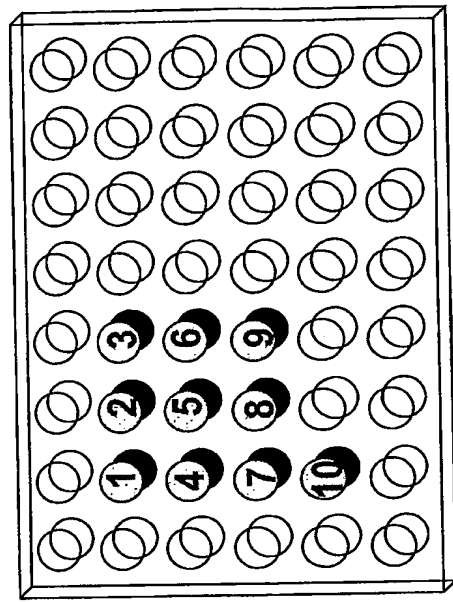


4843PTIT

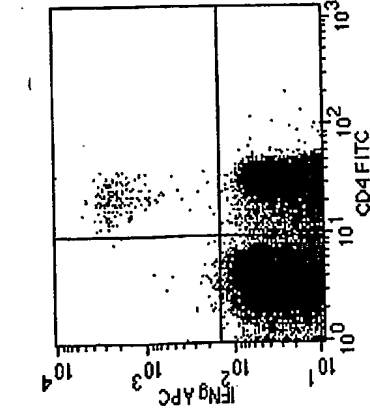
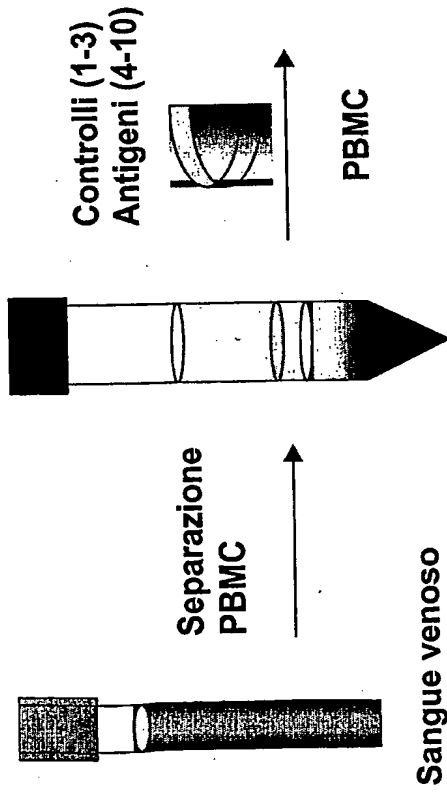
Tavola 6 di 7

Metodica FACS

Figura 4



Stimolazione in piastra da 48 pozzetti

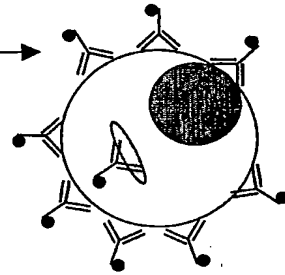


Analisi dei risultati alFACS ed elaborazione della risposta

Incubazione a 37°C per 16h



Brefeldina dopo 1 h dall'aggiunta degli stimoli



Colorazione in immunofluorescenza



Metodica ELISA su sangue intero

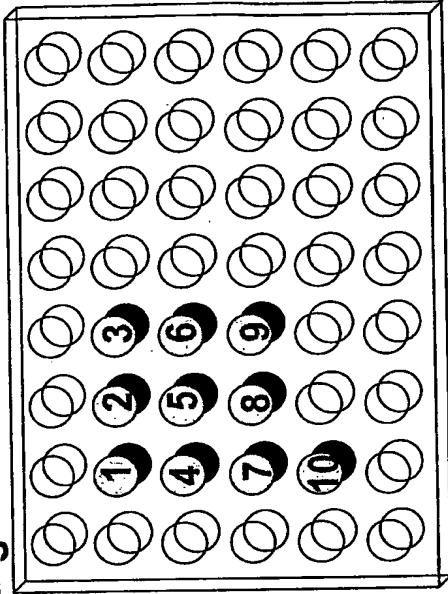
Figura 5



Controlli (1-3)
Antigeni (4-10)



Sangue intero



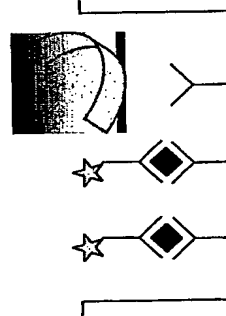
Stimolazione in piastra da 48 pozzetti

Sangue venoso
in eparina (7 mL)

Incubazione
a 37°C per 24h

Raccolta del plasma

Colore



ELISA per IFN-γ

